In vivo Untersuchungen zur zyklischen Photophosphorylierung beim Wildtyp und bei Photosynthesemutanten von Scenedesmus obliquus

von

Günter Hirt

Augsburg

Januar 1972

Fotodruck: W. Deisinger, München

In vivo Untersuchungen zur zyklischen Photophosphorylierung beim Wildtyp und bei Photosynthesemutanten von Scenedesmus obliquus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Günter Hirt
aus
Augsburg

Januar 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Tanner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 18.2.1972

INHALTSVERZEICHNIS

Teil I

Anaerobe Photoassimilation von Glucose und Photoreduktion als Indikatoren einer zyklischen Photophosphorylierung in vivo

Seite

A. EINLEITUNG 2

B. MATERIAL und METHODEN 9
1. Versuchsobjekte und Anzuchtbedingungen 9
2. Versuchsbedingungen und Bestimmungsmethoden 9
2.1 Photoreduktion 10
2.2 Photosynthese 13
2.3 Anaerobe Glucoseassimilation 13

C. ERGEBNISSE und DISKUSSION 16
1. Photosynthese, Photoassimilation von Glucose und Photoreduktion in Abhängigkeit von der Lichtintensität 16
1.1 Photoassimilation von Glucose als möglicher Indikator für die Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung 19
1.2 Photoreduktion als Indikator für die Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung 23
2. Wirkung von DCMU und Antimycin A auf die Photoassimilation von Glucose und die Photoreduktion 28
2.1 Anaerobe Photoassimilation von Glucose . 29
2.2 Photoreduktion 32

D. SCHLUSSBETRACHTUNG 40

E. ZUSAMMENFASSUNG 45

Teil II

Regulation der Glykolyse durch zyklische Photophosphorylierung

Seite

A. EINLEITUNG 48

B. MATERIAL und METHODEN 54
1. Versuchsobjekte und Anzuchtbedingungen 54
2. Versuchsbedingungen 54
2.1 Versuche mit Weißlicht 54
2.2 Versuche mit monochromatischem Licht ... 54
2.3 Versuche zur Wirkung von Licht auf Gärungszwischenstoffkonzentrationen 56
3. Bestimmungsmethoden 58
3.1 Bestimmung der alkoholischen Gärung 58
3.2 Messung der Ansäuerung 58
3.3 Bestimmung von Gärungsprodukten und Gärungszwischenstoffen im optischen Test 58
3.4 Säulenchromatographische Bestimmung von ^{14}C-Säuren 61
3.5 Bestimmung der anaeroben Aufnahme von Zuckern 63
3.6 Chemikalien 64

C. ERGEBNISSE und DISKUSSION 65
1. Hemmung der Gärung von Scenedesmus obliquus D_3 und der Mutante 11 durch Licht 65
1.1 Wirkung von Licht auf die D-Laktatbildung 65
1.2 Wirkung von Licht auf die pH-Verschiebung 70
1.3 Hemmung der D-Laktatbildung im Licht-Dunkelwechsel 72
1.4 Wirkung von Licht auf Glykolysezwischenstoffe 73
1.5 Wirkung von CCP auf die Hemmung der D-Laktatbildung durch Licht 77
2. Förderung der Gärung von Scenedesmus 8 durch Licht 80

Seite

2.1 Wirkung von Licht auf die D-Laktat-bildung 80

2.2 Wirkung von Licht auf die pH-Verschiebung 82

2.3 Bestimmung aller sauren Produkte von Scenedesmus 8 und ihrer Veränderung im Licht 82

2.4 Abhängigkeit der Gärungsstimulierung von der Lichtqualität und Lichtintensität .. 87

2.5 Wirkung von DCMU auf die lichtabhängige D-Laktat-Stimulierung 90

2.6 Gärungsstimulierung im Licht-Dunkelwechsel 91

2.7 Wirkung von Licht auf Glykolysezwischenstoffe von Scenedesmus 8 92

2.8 Einfluß von Licht auf die Aufnahme von Glucoseanalogen 95

D. SCHLUSSBETRACHTUNG 99

E. ZUSAMMENFASSUNG 105

LITERATURVERZEICHNIS 108

ABKÜRZUNGEN 115

Teil I

Anaerobe Photoassimilation von Glucose und Photoreduktion als Indikatoren einer zyklischen Photophosphorylierung in vivo

A. EINLEITUNG

Eine der wichtigsten Entdeckungen der Photosyntheseforschung der vergangenen Jahre war der Befund, daß an den photosynthetischen Primärreaktionen, d.h. dem mit einer ATP-Bildung gekoppelten Elektronenfluß vom Wasser zum NADP, zwei Pigmentsysteme mit verschiedenen Absorptionseigenschaften beteiligt sind.

Abb.1 zeigt ein Schema, das erstmals von Hill und Bendall (1960) eingeführt wurde, in dem die beiden Chlorophyllsysteme, von Duysens als System I und II benannt, in Serie geschaltet sind. Dieses Konzept wurde durch Arbeiten von Duysens et al. (1961), Witt et al. (1961) und von Kok und Hoch (1961) entwickelt. Es erklärt den "Emerson enhancement effect" (Emerson et al. 1957), wonach eine maximale Photosyntheseleistung erst beim Einstrahlen von Licht zweier Wellenlängen ($\lambda_1 < 680$ nm, $\lambda_2 > 680$ nm) erreicht wird. Die Potentialdifferenz zwischen H_2O und NADP wird in diesem "Zick-Zack-Schema" durch zwei Lichtreaktionen überwunden. Durch Anregung von Elektronen im Photosystem II wird eine Substanz Q, nach neueren Messungen mit einem mittleren Redoxpotenzial von -150 mV (Cramer und Butler 1969, Amesz et al. 1970), reduziert und gleichzeitig eine Substanz Y oxidiert. Y, zwischen Wasser und Photosystem II lokalisiert, besitzt ein Redoxpotential um +800 mV und ist für die photosynthetische Sauerstoffentwicklung verantwortlich. An dieser Reaktion sollen Mangan- und Chloridionen beteiligt sein (Kessler 1957, Izawa et al. 1969, Cheniae und Martin 1970). Die chemische Natur des Elektronenakzeptors von Photosystem II, der wegen seiner Fluoreszenz-löschenden Eigenschaft als Quencher Q (Duysens 1963a) bezeichnet wird, ist noch nicht klar. Nach Malkin und Kok (1966) besitzt dieser Faktor zwei Komponenten, Q und P, von denen P möglicherweise Plastochinon ist, das bislang nach Q als erster Carrier in der Elektronentransportkette zum Pigmentsystem I fungierte. In dieser Kette ist weiter Cytochrom b_{559} lokalisiert, das nach Levine (1969) möglicherweise Elektronen auf Cytochrom f überträgt. Cytochrom f (E_o = +370 mV) und Pla-

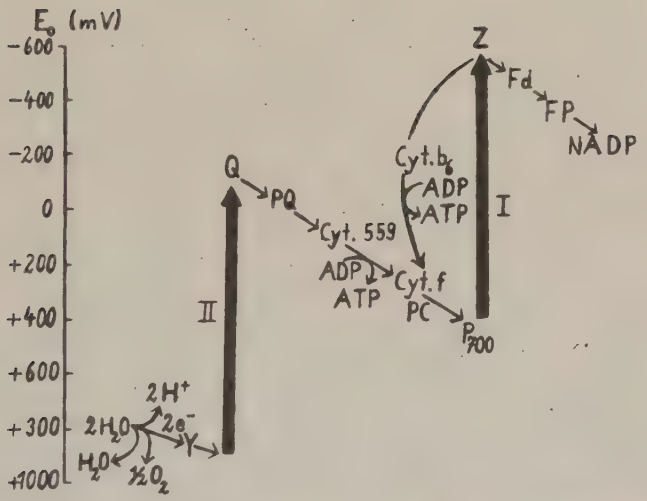

Abb.1: Schema der Primärreaktionen der Photosynthese

stocyanin (E_o = +390 mV) besitzen sehr ähnliche Redoxpotentiale, es ist deshalb noch nicht klar, welches der beiden Elektronendonator für Photosystem I ist. Der Potentialverlust der Elektronen zwischen Q und Photosystem I, von Kok P_{700} genannt (E_o = +430 mV), wird zur Bildung von ATP verwendet. Im Pigmentsystem I angeregte Elektronen reduzieren eine noch unbekannte Substanz Z, mit einem Redoxpotential bis zu -700 mV (Kok et al. 1965) und werden von hier auf Ferredoxin (E_o = -420 mV) übertragen. Die Reduktion von NADP erfolgt dann über ein Flavoprotein, der Ferredoxin-NADP-Reduktase. Dieser Elektronenfluß vom H_2O zum NADP ist als "nichtzyklischer Elektronentransport" bekannt und ist mit einer Sauerstoffentwicklung, der Bildung von ATP und $NADPH_2$ verbunden. Diese ATP-Bildung wurde von Arnon (1959) als nichtzyklische Photophosphorylierung bezeichnet.

Bei der Belichtung von Chloroplastenfragmenten mit geeigneten Cofaktoren, z.B. PMS oder Vitamin K in einer Stickstoffatmosphäre, findet nach Arnon et al. (1958) eine ATP-Bildung ohne weitere meßbare Änderung statt. In dieser "zyklischen Photophosphorylierung" wandern Elektronen, die durch P_{700} angeregt wurden und Substanz Z reduziert haben, nicht über Ferredoxin zum NADP, sondern kehren zur Elektronentransportkette zwischen den beiden Pigmentsystemen zurück und werden durch P_{700} aufs neue angeregt. Als charakteristischer Redoxcarrier für diese zyklische, mit einem langwelligen Photosystem I verbundenen Photophosphorylierung gilt Cytochrom b_6 (E_o = -180 mV, Fan und Cramer 1970). Ob Cytochrom b_6 über Ferredoxin, der einzigen Antimycin-empfindlichen zyklischen Photophosphorylierung (Tagawa et al. 1963) reduziert wird, ist nicht sicher, da dieses Cytochrom nach Ergebnissen von Weikard (1968) direkt durch Photosystem I reduziert werden kann. Wenn auch die Stelle des Eintritts der "zyklischen Elektronen" in die Transportkette des nichtzyklischen Elektronenflusses noch nicht bekannt ist, so gilt es inzwischen als sicher, daß die Phosphorylierungsstelle nicht mit der des offenkettigen Systems identisch ist (Ref. siehe Trebst 1970).

Neben dieser zyklischen, Photosystem I-abhängigen Phosphorylierung existiert noch ein "pseudozyklisches System" mit einer pseudozyklischen Photophosphorylierung (Arnon et al. 1961, 1964). Ein pseudozyklischer Elektronenfluß kommt durch eine, mit Hilfe von Sauerstoff erfolgende Oxidation von reduziertem Ferredoxin bei Abwesenheit von oxidiertem NADP zustande. Da hierbei kein nach außen meßbarer Gaswechsel stattfindet, ähnelt diese pseudozyklische Photophosphorylierung der zyklischen unter anaeroben Bedingungen. Der Elektronenfluß gleicht jedoch dem nichtzyklischen, da er vom Wasser ausgeht, man kann deshalb auch von einer Ferredoxin- katalysierten, nichtzyklischen aeroben Photophosphorylierung sprechen. Sie tritt besonders bei hohen Lichtintensitäten auf, wenn die Elektronencarrier stark reduziert sind und nur wenig oxidiertes NADP zur Verfügung steht.

Nach Calvin (1956) sind zur Reduktion von einem Mol CO_2 zwei Mol reduziertes NADP und mindestens 3 Mol ATP nötig. In der nichtzyklischen Photophosphorylierung werden bei einer P/2e-Rate von 1 (Del Campo et al. 1968) pro 2 $NADPH_2$ nur 2 Mol ATP gebildet. Nach Arnon et al. (1967) soll das dritte Molekül ATP durch zyklische Photophosphorylierung gebildet werden. Die Hypothese einer stöchiometrischen Beteiligung der zyklischen Photophosphorylierung an der CO_2-Fixierung kann jedoch auf Grund zahlreicher Hinweise aus in vivo Versuchen, auf die an anderer Stelle eingegangen wird, nicht bestätigt werden. Diese Tatsache soll nur aufzeigen, daß neben den Versuchen mit Chloroplasten und Chloroplastenfragmenten, die sicher durch Messung zahlloser Teilreaktionen mit künstlichen Elektronendonatoren und Akzeptoren wesentlich zur Klärung des oben beschriebenen Photosyntheseschemas beigetragen haben, auch Versuche mit intakten Zellen von großer Wichtigkeit sind, denn nur mit ihnen lassen sich die physiologische Bedeutung und das Zusammenspiel der einzelnen Phosphorylierungsarten erforschen.

Photophosphorylierung in vivo kann auf zweierlei Arten gemessen werden. Einmal direkt durch Messung von ATP- und Phosphatpoolschwankungen. Hier wären unter anderem zu nennen die Erhöhung des ATP-Gehalts in Blättern bei Belichtung (Forti und Parisi 1963, Santarius und Heber 1965) und der Phosphatabfall in Chlorellazellen beim Lichteinschalten (Kandler 1950). Zum anderen in indirekter Weise durch Messung von Reaktionen, die einer ständigen Versorgung mit ATP bedürfen, z.B. die lichtabhängige Glucoseaufnahme bei Chlorella (Kandler 1954) und bei Blättern (Maclachlan und Porter 1959), die Aufnahme zweiwertiger Ionen (Marré et al. 1963), die Kaliumaufnahme bei Nitella (Mac Robbie 1965) und die Chloridionenaufnahme bei Elodea (Jeschke 1967).

Diese unterschiedlichen, an verschiedenen Objekten gemessenen Prozesse können alle im Licht unter anaeroben Bedingungen bei Abwesenheit von CO_2 ablaufen. Da in einer Stickstoffatmosphäre die oxidative Phosphorylierung verhindert wird und durch das Fehlen von CO_2 der nichtzyklische Elektronentrans-

port zum Erliegen kommt, sind diese Reaktionen unter solchen Bedingungen Ausdruck einer zyklischen Photophosphorylierung in vivo. Diese Teilreaktion manifestiert sich außerdem bei der Anwendung von Giften, insbesondere von Derivaten des Phenylharnstoffs, die erstmals von Wessels und van der Veen (1956) als Hemmstoffe der Hillreaktion eingeführt wurden. So haben z.B. DCMU-Konzentrationen, die die Sauerstoffentwicklung oder CO_2-Fixierung völlig blockieren, nur geringen Einfluß auf die anaerobe Photoassimilation von Glucose durch Chlorella (Tanner et al. 1966), den lichtabhängigen ^{32}P-Einbau in die organische Phosphatfraktion von Ankistrodesmus unter N_2 (Simonis 1967) und die lichtabhängige Chloridionenaufnahme von Elodea bei Abwesenheit von CO_2 (Jeschke 1967). Eine weitere Möglichkeit zyklische Photophosphorylierung in vivo zu zeigen, wird durch Einstrahlen von Licht der Wellenlänge > 700 nm gegeben, das spezifisch Pigmentsystem I anregt. So besitzen nach Wiessner (1965) und Tanner et al. (196[illegible] die lichtabhängige Acetat- und Glucoseaufnahme bei 710 nm den geringsten Quantenbedarf.

Neben diesen Methoden, insbesondere zur Messung der zyklischen Photophosphorylierung, hat die Isolierung von Photosynthesemutanten in den letzten Jahren neue interessante Möglichkeiten gebracht, photosynthetische Teilreaktionen in vivo zu studieren. Photosynthesemutanten von Chlamydomonas wurden von Levine und Ebersold bereits 1960 beschrieben. Bishop gelang 1962/63 die Isolierung von mehreren, durch UV-Bestrahlung erzeugten Scenedesmusmutanten, von denen zwei, Scenedesmus 8 und 11, hier näher beschrieben werden sollen. Beide besitzen einen normalen Chlorophyll- und Carotinoidgehalt, sind also keine Pigmentmutanten. Durch Elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie erwies sich die Mutante 8 als eine Photosystem I-Mutante, die nur noch Lichtreaktion II besitzt (Butler und Bishop 1963). Sie hat die Fähigkeit zur Photophosphorylierung und zur CO_2-Fixierung verloren, kann jedoch unter Sauerstoffentwicklung in einer Hillreaktion Benzochinon reduzieren. Diese mit ganzen Zellen gezeigten Eigenschaften konnten von Pratt und Bishop (1968) auch durch

Versuche mit Chloroplasten dieser Mutante bestätigt werden. Mutante 11 besitzt nur das schmale schnelle R-Signal, das nach Beinert und Kok (1963) für die oxidierte Form des P_{700} charakteristisch ist. Sie erwies sich damit als Photosystem II-Mutante. Sie kann keinen Sauerstoff entwickeln und photosynthetisch kein CO_2 fixieren, ist aber zur Photoreduktion befähigt (Bishop 1962). In dieser von Gaffron (1940) erstmals beschriebenen Reaktion können bestimmte Algen, die das Enzym Hydrogenase nach einer anaeroben Inkubationszeit entwickeln, im Licht in einer H_2-Atmosphäre CO_2 reduzieren, wobei Wasserstoff an Stelle von Wasser als Elektronendonator dient. Dieser Prozeß besitzt nach Bishop (1967) in Licht zwischen 700 und 720 nm die beste Quantenausbeute und erwies sich somit als Photosystem I-abhängige Reaktion.

Die Fähigkeit der Mutante 11 zur anaeroben Photoassimilation von Glucose (Tanner et al. 1967) war deshalb ein weiterer Beweis, daß dieser Prozeß unter Stickstoff allein durch zyklische Photophosphorylierung betrieben wird, zumal bei Scenedesmus 11 störende Effekte von endogen entwickeltem Sauerstoff und dadurch angekurbelter Atmung oder pseudozyklischer Photophosphorylierung im Gegensatz zum Wildtyp ausgeschlossen sind. Dieser Vorteil der Mutante und die Möglichkeit mit ihr, wie auch mit dem Wildtyp, Photosystem I anhand von zwei verschiedenen Indikatorreaktionen, Glucoseassimilation und Photoreduktion, studieren zu können, waren gute Voraussetzungen für weitere Untersuchungen zur zyklischen Photophosphorylierung in vivo. Die nachfolgend beschriebenen Versuche befassen sich mit zwei Problemkreisen:

1. Die anaerobe Glucoseassimilation von Chlorella (Tanner et al. 1965, 1969, Kandler und Tanner 1966) und von Scenedesmus (Tanner et al. 1967) ist im Gegensatz zur Photosynthese bei sehr niedrigen Lichtintensitäten gesättigt. Eine ähnlich niedrige Lichtsättigung zeigen in vivo auch verschiedene andere, unter anaeroben Bedingungen von der ATP-Versorgung aus der zyklischen Photophosphorylierung abhängige Prozesse (Wintermans 1955, Jeschke und Simonis 1969,

Raven 1971). Diese frühe Sättigung wurde von Tanner neben der im Unterschied zur Photosynthese starken Hemmbarkeit der Glucoseassimilation durch Entkopplergifte (Kandler und Tanner 1966, Tanner et al. 1969) als weiterer Hinweis für eine nicht stöchiometrische Beteiligung der zyklischen Photophosphorylierung an der CO_2-Fixierung gewertet. Der Vergleich der Sättigungskurven von Glucoseassimilation und Photoreduktion, einem ganz im Chloroplasten ablaufenden Prozeß, sollte Aufschluß geben, ob diese frühe Sättigung der Glucoseaufnahme tatsächlich durch eine limitierende zyklische Photophosphorylierung oder irgendeinen limitierenden Transportschritt bedingt ist.

2. Neben der großen Empfindlichkeit gegenüber Entkopplergiften zeigte sich auch eine Hemmbarkeit der Glucoseassimilation bei höheren DCMU-Konzentrationen und durch Antimycin A, das wiederum die Photosynthese wenig beeinflußt. Aus diesem Grund wurde auf eine zweite DCMU-Hemmstelle und die Beteiligung von Cytochrom b_6 an der zyklischen Photophosphorylierung in vivo geschlossen (Tanner et al. 1965). Diese an Chlorella gemachten Beobachtungen sollten anhand der Mutante 11 überprüft werden. Im Vergleich mit ihrer Wirkung auf die Photoreduktion wurden neue Informationen über die Spezifität dieser Gifte als Hemmstoffe der zyklischen Photophosphorylierung erwartet.

B. MATERIAL und METHODEN

1. Versuchsobjekte und Anzuchtbedingungen

Alle Versuche wurden mit der einzelligen Grünalge Scenedesmus durchgeführt. Verwendet wurde Scenedesmus obliquus Stamm D_3 und die 1962 von Bishop isolierte Scenedesmusmutante 11. Die Anzucht erfolgte bei 28°C im Kulturmedium von Kessler et al. (1957). Etwas verändert enthielt es pro Liter folgende Bestandteile: 0,81 g KNO_3; 0,47 g NaCl; 0,48 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; 0,36 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 625 µg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 625 µg H_3BO_3; 250 µg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 25 µg $(NH_4)Mo_{37}O_{24} \cdot 4H_2O$; 3 ml gesättigte EDTA-Lösung, ferner 2 g Glucose und 0,25 g Hefeextrakt. Auch der Scenedesmus Wildtyp wurde mit Glucose und Hefeextrakt angezogen, damit in den Versuchen stets Zellen mit einem zur Mutante 11 vergleichbaren Ernährungszustand verwendet wurden.

Je 400 ml Medium wurden in Liter-Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen autoklaviert und mit Algen aus Kulturröhrchen steril beimpft. Nach ca 3-4 Tagen- (Wildtyp) und 6-7 Tagen- (Mutante 11) Anzucht bei Tageslicht in einem Schüttelinkubator wurden die Algen durch Abzentrifugieren in einer Becherzentrifuge bei 2500 U/min geerntet und zwei- bis dreimal mit dest. H_2O gewaschen.

2. Versuchsbedingungen und Bestimmungsmethoden

Für alle Messungen wurden rechteckige Warburggefäße von etwa 18 ml Gesamtvolumen verwendet. Um eine gleichmäßige Beleuchtung zu gewährleisten und das seitliche Eindringen von Licht zu verhindern, wurden die Gefäße mit Metallrahmen umgeben, die bei allen Gefäßen eine gleich große Grundfläche freiließen. Die meisten Versuche wurden in der Warburgapparatur Typ SL 85 G von Braun Melsungen durchgeführt. Hier dienten als Lichtquellen Leuchtstoffröhren Osram L 40 W 20 R mit einer maximalen Beleuchtungsstärke von 7000 Lux, gemessen in der Höhe der Warburggefäßböden. Zur besseren Abgrenzung der Licht-

sättigung der Photoreduktion gegen die Photosynthese diente ein Rund-Warburgapparat Typ VL derselben Firma mit 14 Kugellampen (40 W). Die Lichtintensitätsmessung erfolgte mit einem Luxmeter der Firma Dr.B.Lange Berlin. Die Beleuchtungsstärke konnte durch Einlegen von feinmaschigen Messingdrahtgittern und Filterpapieren in die Metallrahmen nach Belieben verändert werden. Die Versuchstemperatur betrug in allen Experimenten 28°C.

2.1 Photoreduktion

a. Algendichte und Versuchsansatz
Nachdem die Algen dreimal mit dest. H_2O gewaschen waren, wurden sie in ca 10 ml dest. H_2O aufgenommen und 0,5 ml dieser Suspension nach einer Verdünnung von 1:100 zur Trübungsmessung gegen dest. H_2O in einem Eppendorf-Photometer bei 546 nm und 1 cm Schichtdicke herangezogen. Zur Photoreduktionsmessung wurde eine Algensuspension mit einer Extinktion von 0,21 bei einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Das entspricht einem Chlorophyllgehalt von ca 130 µg/ml. Diese Algendichte erwies sich bei einer Beleuchtungsstärke von 1750 Lux als optimal. Pro Warburggefäß wurden 2,5 ml Algensuspension einpipettiert. Die Zellen waren in 0,03 M Na-Phosphatpuffer suspendiert(pH 6,5).

Zur Chlorophyllbestimmung nach Arnon (1949) wurde eine bestimmte Algenmenge abzentrifugiert und mehrmals mit Methanol bei 60°C extrahiert, bis Rückstand und Überstand farblos waren. Die Überstände wurden vereinigt mit Methanol auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und die Extinktion bei 645 und 663 nm gemessen. Der Chlorophyllgehalt errechnet sich dann aus der Gleichung

$(20{,}5 \cdot E_{645} + 8{,}02 \cdot E_{663}) \cdot V \cdot 10^{-3}$ = mg Chlorophy

(V = Gesamtvolumen).

b. Aktivierung der Hydrogenase
Dazu wurde die Algensuspension in den Warburggefäßen

10 Minuten mit einem 96% H_2/4% CO_2-Gasgemisch begast, danach ca 17 Stunden im Dunkeln gehalten. Bestimmte Stoffe mußten kurz vor Versuchsbeginn zugegeben werden, z.B. Glucoselösung bei simultaner Messung von Photoreduktion und Glucoseassimilation oder Gifte, die die Adaptation beeinflussen konnten. Sie befanden sich während der Dunkel-Inkubation im Seitenkipper und wurden kurz vor Belichtung zur Algensuspension gekippt. Beim Scenedesmus Wildtyp mußte die Hydrogenaseaktivität während der Belichtung durch DCMU (Endkonzentration, wenn nicht anders vermerkt, 10^{-5} M) stabilisiert werden.

c. Manometrische Messung

Die Gasaufnahme wurde als Druckabfall (mm Brodie-Lösung) bei konstantem Volumen gemessen. Temperatur- und Außendruckschwankungen wurden mit Hilfe eines Thermobarometers korrigiert. Die Gasaufnahme in µl ergab sich durch Multiplikation der Druckänderung ΔH mit der Gefäßkonstante k. Diese berechnet sich aus der Gleichung

$$K = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{P_o}$$

worin V_g das Volumen der Gasphase im Gefäß plus Manometer, V_f das Volumen der flüssigen Phase und α der Absorptionskoeffizient des zu messenden Gases bei der Versuchstemperatur T in ^oK bedeuten. P_o ist die 760 mm Quecksilbersäule entsprechende Höhe der Manometerflüssigkeit, bei Brodie-Lösung 10 000 mm (Umbreit et al. 1959).

Da bei der Photoreduktion gleichzeitig zwei Gase, H_2 und CO_2 im Verhältnis 2:1 aufgenommen werden, die beiden Absorptionskoeffizienten aber sehr verschieden sind, kann der gemessene Druckabfall in mm Brodie-Lösung nicht einfach in $\frac{2}{3}$ H_2 und $\frac{1}{3}$ CO_2 geteilt werden, um die Aufnahme eines der beiden Gase zu berechnen. Aus den beiden Absorptionskoeffizienten er-

gibt sich bei 28°C, daß bei der Photoreduktion 69,2% der gemessenen Druckänderung in mm Brodie-Lösung auf Kosten von Wasserstoff, der Rest auf Kosten von CO gehen.

Die Photoreduktion beginnt stets mit einer Lagphase von ca 10 Minuten. Abb.2 zeigt dazu ein typisches Experiment:

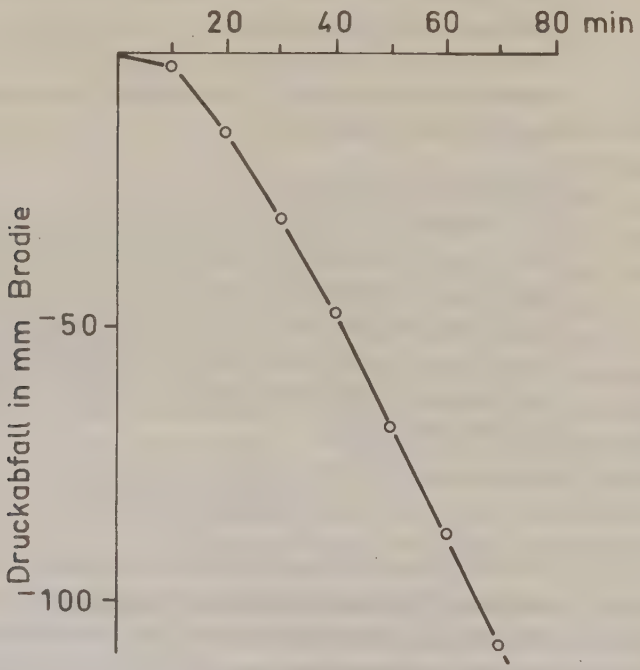

Abb. 2: Photoreduktion von Scenedesmus 11
Lichtintensität 7000 Lux

Bei der Berechnung der H_2- und CO_2-Fixierungsraten wurden diese 10 Minuten nicht einbezogen. Die Ablesung der Druckänderung erfolgte in 10 Minuten-Abständen. In allen Versuchen wurde eine Dunkelkontrolle mitgeführt, deren Gasaufnahme in der Regel vernachlässigt werden konnte.

2.2 Photosynthese

a. Algendichte und Versuchsansatz
Da die Photosynthese mit der Photoreduktion verglichen werden sollte, wurde dieselbe Algendichte und dieselbe Algensuspensionsmenge wie bei den Photoreduktionsmessungen verwendet.

b. Manometrische Messung
Die Messungen erfolgten bei konstantem CO_2-Druck. Dazu waren die Algen in 0,1 M Na-Carbonatpuffer ($NaHCO_3$: Na_2CO_3 = 9:1) suspendiert. Die Ablesung der Druckzunahme auf Grund der O_2-Entwicklung geschah in 10 Minuten-Abständen. Zur Atmungskorrektur wurden Dunkelkontrollen mitgeführt.

2.3 Anaerobe Glucoseassimilation

a. Algendichte und Versuchsansatz
Zum Vergleich mit Photoreduktion und Photosynthese wurde dieselbe oben beschriebene Algendichte und dasselbe Flüssigkeitsvolumen verwendet. Die Zellen waren wieder in 0,03 M Na-Phosphatpuffer suspendiert. Die Glucoseanfangskonzentration war 7,8 millimolar. Bei der Scenedesmusmutante 11 betrug die Belichtungsdauer 3-4 Stunden, beim Scenedesmus Wildtyp genügten auf Grund der größeren Aufnahmerate etwa 2 Stunden. Die Glucose wurde kurz vor dem Einpipettieren in die Gefäße zur Algensuspension gegeben. Nach 10 Minuten Begasung mit nachgereinigtem Stickstoff im Dunkeln waren anaerobe Bedingungen gewährleistet und das Licht konnte eingeschaltet werden. Um geringste Spuren von Sauerstoff und CO_2 zu entfernen, befanden sich während aller Versuche im Seitenkipper 0,2 ml eines Pyrogallol/KOH-Gemisches (gesättigte KOH/Pyrogallollsg. 1:0,2) und Filterpapierschnipsel. Während der Begasung mit N_2 wurden zwei Nullproben abzentrifugiert und aus dem Überstand die Glucosekonzentration bestimmt. Dasselbe geschah mit den Proben, deren Aufnahme gemessen werden sollte, am Ende der Versuche.

Die Gesamtaufnahme an Glucose ergab sich als Differenz der Glucoseendkonzentration zur Anfangskonzentration der Nullproben. Nach im Teil II beschriebenen Ergebnissen wird die Gärung des Scenedesmus Wildtyp und der Mutante 11, die eine recht beachtliche Dunkel-Glucoseaufnahme bewirkt, durch Licht vollkommen gehemmt. Es war deshalb nicht nötig die Licht-Glucoseaufnahme mit der Dunkel-Glucoseaufnahme zu korrigieren.

b. Verwendung von Giften
Antimycin A und DCMU wurden in ihrer Wirkung sowohl auf die Photoreduktion als auch auf die Glucoseassimilation erprobt. Wegen seiner geringfügigen Wasserlöslichkeit mußte Antimycin A in reinem Methanol zugegeben werden. Die Algensuspension enthielt dann 1,6% Methanol. Verschiedene DCMU-Konzentrationen wurden durch Verdünnungsreihen mit dest. H_2O aus einer methanolischen 10^{-2}-molaren Stammlösung erhalten. In den Kontrollen befand sich stets dieselbe Methanolmenge wie in den Giftproben. Bei der Wirkung der beiden Gifte auf die anaerobe Glucoseassimilation der Mutante 11 wurde der von Tanner et al. (1967) beschriebene Versuchsansatz verwendet.

c. Glucosebestimmung (Folin und Wu 1929)
Zu 0,5 ml der zu bestimmenden Probelösung werden 1 ml Lösung A (40 g Na_2CO_3; 400 ml dest. H_2O; 7,5 g Weinsäure; 4,5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; ad 1000 ml) zugegeben, die Probe 7 Minuten bei 100°C gekocht und anschließend 3 Minuten in kaltem Wasser gekühlt. Dann gibt man 1 ml Lösung B (35 g Molybdänsäureanhydrid; 400 ml 5%ige NaOH; 30 Minuten kochen, nach dem Abkühlen 125 ml 85%ige H_3PO_4; ad 500 ml) dazu, läßt die Probe 10 Minuten stehen und verdünnt dann mit 10 ml dest. H_2O. Nach gutem Durchmischen und weiteren 40 Minuten wird die entstandene Blaufärbung in einem Zeiss-Spektralphotometer gegen eine Probe mit H_2O, die auf

dieselbe Weise behandelt worden war, bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 691 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt an Hand einer Eichkurve.

C. ERGEBNISSE und DISKUSSION

1. Photosynthese, Photoassimilation von Glucose und Photoreduktion in Abhängigkeit von der Lichtintensität

Schon in der Einleitung wurde auf die im Gegensatz zur Photosynthese frühe Lichtsättigung der Glucoseassimilation hingewiesen. Nach Tanner et al. (1965) hat dieser Prozeß bei Chlorella bereits bei 1200 Lux ein Plateau erreicht, die photosynthetische Sauerstoffentwicklung steigt jedoch bis 6000 Lux linear an. Auch für Scenedesmus Wildtyp und Scenedesmus 11 wurde eine ähnlich niedrige Sättigung der Glucoseassimilation bei 2000 Lux gefunden (Tanner et al. 1967).

Die Lichtsättigung der Photoreduktion läßt sich nur bei einer Stabilisierung der Hydrogenase ermitteln, da nach Gaffron (1940) bereits bei 500 Lux durch O_2-Entwicklung eine Deadaptation und Übergang zur Photosynthese stattfindet. Durch Anwendung hoher Konzentrationen von Orthophenantrolin oder Hydroxylamin und durch Mangan-Mangel, die eine Sauerstoffentwicklung verhindern, fanden Gaffron (1942 a, 1945) und Kessler (1957) eine Lichtsättigung der Photoreduktion bei ca 2000 Lux. Bei derselben Intensität ist auch die Photoreduktion von Scenedesmus D_3 (Bishop 1958) bei Anwesenheit von $3 \cdot 10^{-6}$M DCMU gesättigt. Für Ankistrodesmus (Bishop 1961) und für Scenedesmus Wildtyp und Mutante 11 (Bishop 1962) werden Werte zwischen 4000 und 5000 Lux beschrieben. Nach Nührenberg (1967) liegt die Sättigung der Photoreduktion von Chlorella pyrenoidosa bei 500 Lux und von Scenedesmus 11 bei 1500 Lux.

Diese Ergebnisse zeigen sowohl Übereinstimmung als auch Unterschiede zur Lichtsättigung der Photoassimilation von Glucose, lassen jedoch wegen der Verwendung unterschiedlicher Objekte und verschiedener Algendichten keinen stichhaltigen Vergleich zu.

Abb.3 zeigt einen Vergleich zwischen Lichtsättigungskurven von Photosynthese, Photoreduktion und Glucoseassimilation am Scenedesmus Wildtyp.

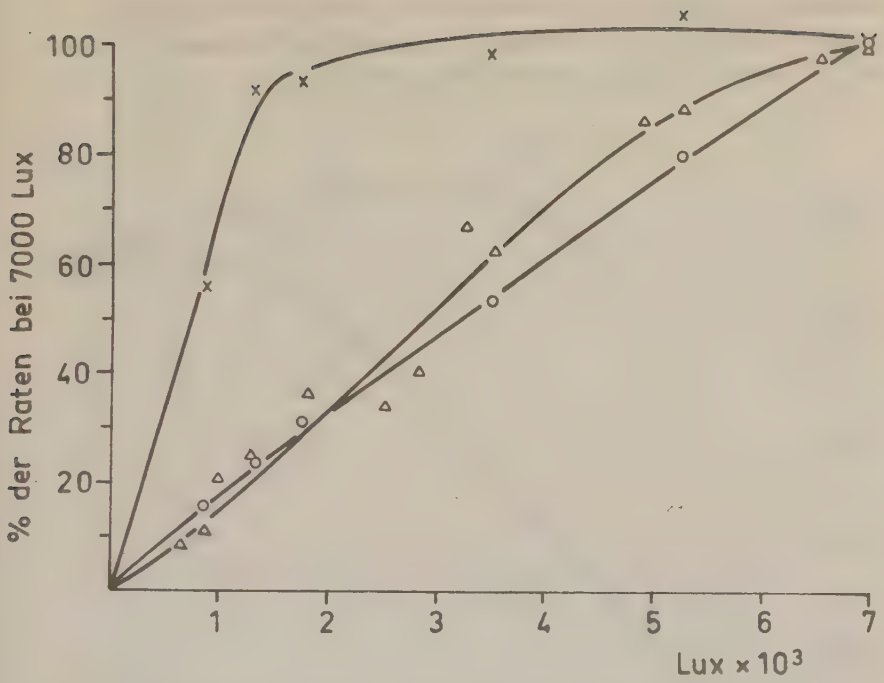

Abb.3: Photoassimilation von Glucose, Photoreduktion und Photosynthese von Scenedesmus Wildtyp in Abhängigkeit von der Lichtintensität

×Glucoseassimilation △Photoreduktion ○Photosynthese

Auch hier findet sich wie bei Chlorella, der große Unterschied zwischen anaerober Glucoseassimilation, Sättigung zwischen 1000 und 2000 Lux und der Photosynthese, die bis 7000 Lux einen linearen Anstieg zeigt. Die erwartete Übereinstimmung zwischen Glucoseassimilation und Photoreduktion wurde nicht gefunden. Wie bei der Mutante 11 (Abb.4) war die Photoreduktion erst bei 5-6000 Lux gesättigt. Diese Werte stimmen am besten mit denen von Bishop (1961, 1962) für Ankistrodesmus und Scenedesmus 11 berichteten überein, stehen jedoch im Gegensatz zu dem von Nührenberg (1967) beschriebenen Wert von 1500 Lux für Scenedesmus 11, der möglicherweise auf die Verwendung von dünneren Algensuspensionen zurückzuführen ist.

Um Photoreduktion und Photosynthese etwas besser gegeneinander abgrenzen zu können, wurden diese Prozesse am Wildtyp noch bei höheren Intensitäten untersucht.

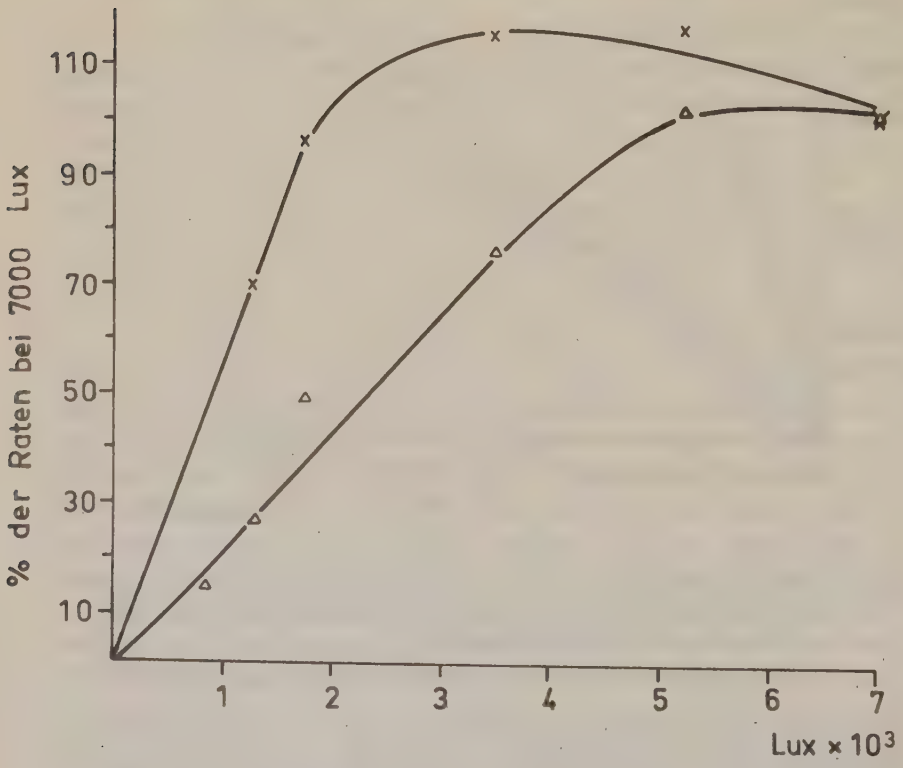

Abb.4: Photoassimilation von Glucose und Photoreduktion von Scenedesmus 11 in Abhängigkeit von der Lichtintensität

× Glucoseassimilation △ Photoreduktion

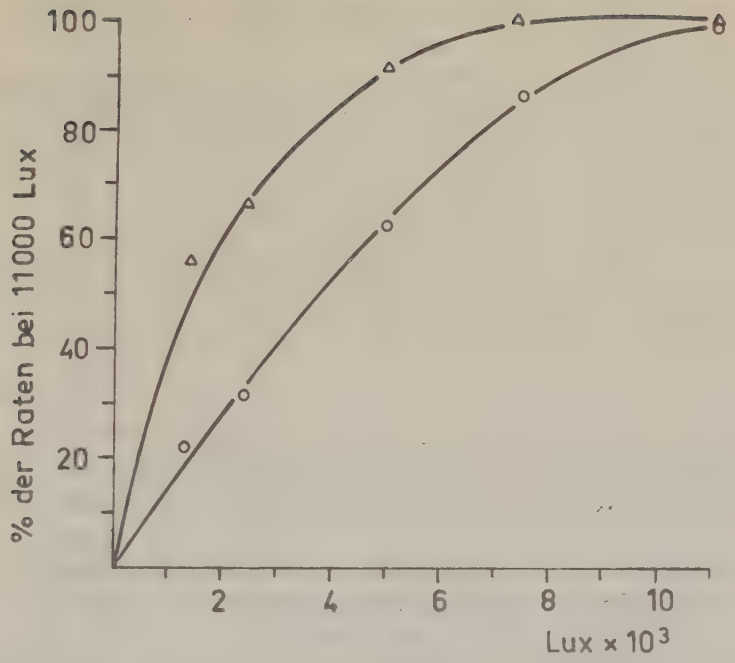

Abb.5: Bestimmung der Lichtsättigung von Photoreduktion und Photosynthese beim Scenedesmus Wildtyp

△ Photoreduktion ○ Photosynthese

Abb.5 zeigt einen deutlichen Unterschied der Sättigungskurven, danach ist die Photoreduktion früher, etwa zwischen 5000 und 7000 Lux gesättigt, die Photosynthese biegt erst bei 7500 Lux um und steigt bis 11 000 Lux noch weiter an.

1.1 Photoassimilation von Glucose als möglicher Indikator für die Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung

Nachdem ein so deutlicher Unterschied in der Lichtsättigung zweier Lichtreaktion I-abhängiger Prozesse gefunden wurde, stellte sich die Frage, ob überhaupt einer und dann welcher der beiden die tatsächliche Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung zeigt. Ist es die Glucoseassimilation, so gibt es zwei Möglichkeiten die spätere Sättigung der Photoreduktion zu erklären:

a. Beteiligung von Lichtreaktion I und II an der Photoreduktion

Nachdem kein großer Unterschied in der Lichtsättigung zwischen Photoreduktion und Photosynthese gefunden wurde, muß die Möglichkeit einer Beteiligung von Lichtreaktion II an der Photoreduktion in Betracht gezogen werden. So weist nach Kessler (1968) die niedrige Fluoreszenz von normalen Ankistrodesmuszellen unter H_2/CO_2 im Gegensatz zur wesentlich höheren, bei aerob gehaltenen, DCMU-vergifteten oder Manganmangelalgen, auf eine Beteiligung von Photosystem II an der Photoreduktion hin. Da nach Bisnop (1958) die Photoreduktion DCMU-unempfindlich ist, vermutet Kessler eine DCMU-Hemmstelle vor der zweiten Lichtreaktion, wie sie von Witt et al. (1961, 1966) postuliert wurde, um die DCMU-Wirkung auf die Absorptionsänderung bei 515 mμ von Chlorella und Chloroplasten zu erklären. Ihre Interpretation wurde jedoch durch Messungen von Fork und De Kouchkovsky (1966), die eine DCMU-Hemmstelle zwischen Q und dem Elektronentransport zum P_{700} annehmen, in Frage gestellt. Nach Duysens und Sweers (1963) hemmt DCMU auf der reduzierenden Seite von Photosystem II. Sie fanden, daß bei Anwesenheit von DCMU die Chlorophyll a- Fluoreszenz rasch ansteigt und im "steady state" erhöht bleibt. Da Licht, das spezifisch Lichtreaktion I anregt, diese Fluoreszenz nicht vermindert, vermuten sie, daß DCMU die Reoxidation von Q durch Photosystem I verhindert. Da niedrige Konzentrationen von DCMU die Reduktion von Plastochinon hemmen, konnte die Hemmstelle zwischen Q und Plastochinon lokalisiert werden (Duysens 1963 b). Weitere Hinweise für eine DCMU-Hemmstelle auf der reduzierenden Seite von Photosystem II kommen aus Versuchen von Joliot (1966), Izawa et al. (1969) und von Elstner et al. (1970). Nimmt man eine DCMU-Hemmstelle nach der zweiten Lichtreaktion als gesichert an, so läßt neben der Unempfindlichkeit der Photoreduktion gegen DCMU (Bishop 1958) auch die Tatsache, daß Photosystem II-Mutanten zur

Photoreduktion befähigt sind (Bishop 1963, Bishop und Wong 1971), eine Beteiligung von Photosystem II als unwahrscheinlich erscheinen. Weiter sprechen auch das Aktionsspektrum der Photoreduktion, mit einem deutlich zum langwelligen Bereich verschobenen Maximum bei 695 nm (Bishop 1967) und das Fehlen eines dichromatischen "enhancement effects" (Gingras 1966) für eine reine Photosystem I-abhängige Reaktion. Der von Kessler zitierte hohe Quantenbedarf der Photoreduktion (Bishop 1967) läßt sich auch erklären, wenn nur Lichtreaktion I an der Photoreduktion beteiligt ist (siehe nächster Abschnitt).

b. Beteiligung von Lichtreaktion I an der Photoreduktion

Bei einer alleinigen Beteiligung von Lichtreaktion I an der Photoreduktion gibt es zwei mögliche Reaktionstypen:

Reaktionstyp 1: Lichtreaktion I ist nur als ATP-Lieferant durch zyklische Photophosphorylierung nötig, die Reduktion von NADP durch Hydrogenase-aktivierten Wasserstoff erfolgt über Ferredoxin und die Ferredoxin-NADP-Reduktase in einer Dunkelreaktion.

Reaktionstyp 2: Neben der Gewinnung von Energie durch zyklische Photophosphorylierung, werden auch die zur NADP-Reduktion nötigen Elektronen durch P_{700} angeregt, d.h. die Hydrogenase füttert Elektronen nicht beim Ferredoxin, sondern vor Lichtreaktion I ein.

Zieht man Reaktionstyp 2 in Betracht, so würde bei der Photoreduktion, im Unterschied zur Glucoseassimilation, bei der Licht sicher nur zyklische Photophosphorylierung bewirkt, ein erhöhter Quantenbedarf nötig sein, was eine Verschiebung der Lichtsättigung zu höheren Intensitäten zur Folge hätte. Eine Beteiligung von P_{700} am Elektronentransport vom Wasserstoff zum NADP wird von

Grimme (1971) gefordert. Nach seinen Ergebnissen ist die Photoreduktion von Chlorella fusca Chloridmangel-empfindlich, die anaerobe Glucoseassimilation und die Dunkelreduktion von Nitrit, Methylenblau oder Methylviologen jedoch nicht. Da die beiden letzten Reaktionen Indikatoren für Reaktionstyp 1 sind, vermutet Grimme die Beteiligung eines, durch Licht im Photosystem I angeregten nichtzyklischen Elektronentransportes zum NADP, der Chloridmangel-empfindlich ist.

Nachdem die CO_2-Fixierung in der Photoreduktion auch über den Calvin-Zyklus läuft (Gingras et al. 1963), sind beim Reaktionstyp 1 zur Reduktion von 1 Mol CO_2, bei einer P/2e-Rate von 1, maximal 6 Mol Quanten nötig. Für Reaktionstyp 2 errechnen sich 10 Quanten, wenn der nichtzyklische Elektronentransport vom Wasserstoff zum NADP mit keiner Phosphorylierung verbunden ist. Nach Bishop (1967) zeigt die Photoreduktion von Scenedesmus obliquus in Gegenwart von DCMU und von Scenedesmus 11, auch auf Grund des geringsten Quantenbedarfs zwischen 705 und 720 nm, die typischen Eigenschaften einer Photosystem I-abhängigen Reaktion. Der niedrigste Quantenbedarf lag jedoch bei 10 Quanten unerwartet hoch. Dieser Quantenbedarf stimmt jedoch sehr gut mit dem für Reaktionstyp 2 errechneten überein. Trifft diese Interpretation zu, so dürfte der nichtzyklische Elektronentransport vom Wasserstoff über Photosystem I nicht mit einer Phosphorylierung verbunden sein, denn sonst würde sich derselbe Quantenbedarf von 6 wie für Reaktionstyp 1 ergeben und eine Sättigung der Photoreduktion bei niedrigeren Intensitäten. Reaktionstyp 2 erklärt zwar eine Sättigung der Photoreduktion bei höheren Intensitäten, es kann deshalb jedoch nicht zwingend gefolgert werden, daß die niedrige Lichtsättigung der Glucoseaufnahme die tatsächliche Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung zeigt.

1.2 Photoreduktion als Indikator für die Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung

Die Photoreduktion kann nur dann Indikator für die Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung sein, wenn Lichtreaktion I allein zur ATP-Bildung verwendet wird (Reaktionstyp 1).

Nachdem in der Hydrogenase-abhängigen Knallgasreaktion von Grünalgen, deren Stöchiometrie nach Gaffron (1942 b) die folgende ist

$$4H_2 + 2O_2 \longrightarrow 4H_2O$$
$$2H_2 + CO_2 \longrightarrow (CH_2O) + H_2O$$

in einer reinen Dunkelreaktion CO_2 auf dieselbe Weise wie in der Photosynthese und der Photoreduktion über den Calvin-Zyklus reduziert wird (Gingras et al. 1963), ist es durchaus möglich, daß auch in der Photoreduktion die Bildung von $NADPH_2$ ohne lichtabhängigen Schritt erfolgt. Die Lichtenergie würde dann wie in Reaktionstyp 1 beschrieben, nur zur zyklischen Photophosphorylierung verwendet. Dieser Mechanismus wurde sowohl für die Bakterienphotoreduktion (Calvin 1956, Arnon 1961, Stanier 1961) als auch für die Photoreduktion bei Algen (Gingras et al. 1960, 1963) angenommen. Läuft die Photoreduktion über diesen Reaktionsmechanismus ab, so zeigt die, im Verhältnis zur Glucoseassimilation, spätere Lichtsättigung der Photoreduktion auch eine spätere Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung an. Zur Erklärung der frühen Lichtsättigung der Glucoseassimilation gibt es dann folgende Möglichkeiten:

a. Limitierung der Photoassimilation von Glucose durch den Transport in die Zelle
   Neben der Glucoseaufnahme gibt es auch andere Prozesse, die durch die Aufnahme von Metaboliten in die Zelle gekennzeichnet sind und die unter zyklischen Photophosphorylierungsbedingungen eine sehr frühe Lichtsättigung zeigen, z.B. die Chloridaufnahme (van Lookeren Campagne 1957, Jeschke 1967), die Kaliumaufnahme (Raven

1971) und die Phosphataufnahme in Polyphosphatfraktionen (Wintermans 1955, van Rensen 1971). Die zunächst am logischsten erscheinende Erklärung für diese Lichtsättigung ist eine Limitierung dieser Prozesse durch den Transport der Metabolite in die Zelle und speziell bei der Glucoseaufnahme durch enzymatische Reaktionen, die zur Umwandlung von Glucose in Oligo- und Polysaccharide führen. Mehrere Gründe sprechen jedoch gegen diese Möglichkeit.

Tab.1: Glucoseassimilation von Scenedesmus Wildtyp Vergleich aerob Dunkel, anaerob Licht

	Glucoseaufnahme mg/mg Chl./Std.	Zahl der Versuche
1750 Lux/N_2	2,05	4
Dunkel/Luft	2,35	4

Der Scenedesmus Wildtyp nimmt nach Tabelle 1 aerob im Dunkeln stets etwas mehr Glucose auf als bei sättigender Lichtintensität unter anaeroben Bedingungen. Wie bei Chlorella (Tanner et al. 1966) ist auch hier eine Steigerung der Glucoseaufnahmerate durch ATP aus der oxidativen Phosphorylierung möglich.

Daneben sprechen auch ganz andere physiologische Phänomene, die von der zyklischen Photophosphorylierung abhängen, gegen eine Limitierung durch den Metabolitentransport. So sind auch die Isocitratlyasesynthese in Chlorella pyrenoidosa (Syrett 1966), der Kok-Effekt bei Anacystis nidulans (Hocht et al. 1963) und der Phosphatabfall in Chlorella vulgaris (Kandler 1957, Klob persönl. Mitteilung) bei sehr niedrigen Lichtintensitäten gesättigt, Prozesse, die unabhängig vom Transport irgendeines Metaboliten in die Zelle sind.

b. Limitierung der Photoassimilation von Glucose durch den ATP-Transport durch die Chloroplastenmembran

Exogen zugegebene Glucose hemmt nach Gaffron (1940) die Photoreduktion von Scenedesmus und zwar sowohl die

Aufnahme von Wasserstoff als auch von CO_2. Bishop (1961) und Gingras (1966) untersuchten diese Erscheinung in Abhängigkeit von der Lichtintensität bei Anwesenheit von DCMU und CMU. Danach wird die Photoreduktion bei niedrigen Lichtintensitäten stark gehemmt, für Ankistrodesmus bei 1000 Lux etwa zu 80% (Bishop), bei höheren Intensitäten nimmt diese Hemmung zunehmend ab. Beide Autoren erklären dieses Phänomen durch eine Konkurrenz von Glucoseassimilation und Photoreduktion um ATP aus der Lichtphosphorylierung. Danach besitzt das Glucoseaufnahmesystem die größere Affinität für ATP. Wird die Lichtintensität, bei der dieses System gesättigt ist, überschritten, dann kann das zusätzlich gebildete ATP zur Photoreduktion verwendet werden. Diese steigt dann mit zunehmender Lichtintensität in gleicher Weise an wie bei Abwesenheit von Glucose (Gingras 1966).

Einfachste Interpretation der Ergebnisse von Bishop und Gingras ist eine, im Gegensatz zur Glucoseassimilation bei höheren Lichtintensitäten gesättigte zyklische Photophosphorylierung. Wichtige Voraussetzung für diese Interpretation ist jedoch, daß bei gleichzeitig ablaufender Photoreduktion auch bei den, die Sättigung der Glucoseassimilation übersteigenden Lichtintensitäten noch genau so viel Glucose aufgenommen wird. Aus den Ergebnissen von Bishop (1961) und Gingras (1966) kann dies nicht zwingend gefolgert werden, einmal, da die Glucoseaufnahme nicht gemessen wurde, zum anderen findet Bishop bereits bei 3000 Lux eine völlige Aufhebung der Photoreduktionshemmung, was eher auf eine Umsteuerung schließen läßt, d.h. auf eine Hemmung der Glucoseassimilation durch die Photoreduktion bei höheren Lichtintensitäten. Dieses Problem wurde mit der Scenedesmusmutante 11 untersucht, da sie gegenüber dem Wildtyp den Vorteil besitzt, kein DCMU zur Stabilisierung der Hydrogenase zu benötigen. Dies ist nicht unwesentlich, da DCMU bei höheren Konzentrationen die Glucoseaufnahme hemmt (Tanner et al. 1965).

Tab.2: Wirkung von Glucose auf die Photoreduktion von Scenedesmus 11

	Glucoseaufn. Kontrolle N_2	Glucoseaufn.u.Photored. in simultaner Messung H_2/CO_2		Photored. Kontrolle H_2/CO_2
	Gluc.Aufn. $\frac{\mu Mol}{mgChl.xStd.}$	Gluc.Aufn. $\frac{\mu Mol}{mgChl.xStd.}$	CO_2-Fixierung $\frac{\mu Mol}{mgChl.xStd.}$	CO_2-Fixierung $\frac{\mu Mol}{mgChl.xStd.}$
1770 Lux	5,65	5,90	1,6	4,55
11000 Lux	4,80	7,45	5,7	13,20

Glucoseanfangskonzentration $2,6x10^{-3}$M, Inkubationszeit 1 Std., alle Messergebnisse sind Mittelwerte aus zwei Parallelproben.

Tabelle 2 zeigt ein typisches Experiment, in dem Glucoseassimilation und Photoreduktion sowohl einzeln als auch simultan in ein und demselben Gefäß gemessen wurden. Zwei weitere Versuche verliefen in gleicher Weise. Die niedrige Lichtintensität war nach Abb.4 für die Glucoseassimilation gerade sättigend, die hohe mit 11000 Lux für die Photoreduktion. Bei 1770 Lux ist die CO_2-Fixierung durch Glucose, wie zu erwarten war, stark gehemmt, sie erhöht sich bei 11000 Lux von 1,6 auf 5,7 µMol pro mg Chlorophyll und Stunde. Dieser Wert liegt jedoch noch wesentlich unter der Kontrollrate von 13,2 µMol, es findet also im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bishop (1961) keine vollkommene Aufhebung der Hemmung statt. Die Glucoseaufnahme der Kontrolle unter N_2 ist bei 1770 Lux gesättigt, bei 11000 Lux wird sogar etwas weniger Glucose aufgenommen. Bei gleichzeitig möglicher Photoreduktion (Spalte 3) wird bei 1770 Lux etwa gleichviel, bei 11000 Lux werden überraschender Weise sogar 2,65 µMol Glucose mehr, als in der Kontrolle unter N_2 aufgenommen.

Die zyklische Photophosphorylierung kann also auch über 1770 Lux hinaus weiter ATP zur Verfügung stellen. Dies zeigt sich auch beim Vergleich der Aufnahmerate

von Glucose mit der CO_2-Fixierungsrate in der jeweiligen Sättigung. Zur Umwandlung von 1 Mol Glucose in Stärke über Uridindiphosphatglucose sind 2 Mol ATP nötig (Leloir 1964), zieht man noch 1 ATP für die aktive Aufnahme von Glucose in Rechnung (Decker und Tanner in Vorbereitung), so wären 3 ATP pro assimilierter Glucose nötig. Nach Tabelle 2 werden dann zur Aufnahme von 5,65 µMol Glucose maximal 17 µMol ATP benötigt, für die Fixierung von 13,2 µMol CO_2 nach dem Calvin-Zyklus jedoch mit 39,6 µMol ATP, etwa das 2,5 fache.

Nachdem der Transport der Glucose in die Zelle und die Umwandlung in Stärke als limitierende Faktoren nicht in Frage kommen, wird die frühe Lichtsättigung der Glucoseassimilation sehr wahrscheinlich durch einen begrenzenden ADP/P_i oder ATP-Transport durch die Chloroplastenmembran verursacht. Diese Interpretation wird auch für die frühe Sättigung der anaeroben Chloridionenaufnahme bei Elodea (Jeschke und Simonis 1969) und für die Kaliumaufnahme bei Hydrodictyon (Raven 1971) bevorzugt. Nach Heldt (1969) ist kein direkter Transport von ATP aus dem Chloroplasten ins Cytoplasma möglich. Heldt und Rapley (1970) und Heber und Santarius (1970) postulieren einen indirekten Transport, wonach Dihydroxyacetonphosphat aus dem Chloroplasten ins Zytoplasma gelangt und dort zu 3-Phosphoglycerinsäure oxidiert wird, wobei ATP und $NADH_2$ gebildet werden. 3-Phosphoglycerinsäure kehrt nun ihrerseits in den Chloroplasten zurück, wo sie auf Kosten von ATP und $NADPH_2$ wieder in Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt wird. Da an diesem Kreislauf $NADPH_2$ beteiligt ist, hängt der ATP-Transport sicher auch von der $NADPH_2$-Konzentration ab. Bei der anaeroben Glucoseassimilation ist möglicherweise im Licht $NADPH_2$ auf Grund eines fehlenden nichtzyklischen Elektronentransports nur in begrenzter Menge vorhanden. Diese $NADPH_2$-Konzentration könnte den ATP-Transport limitieren und gleichzeitig die frühe Lichtsättigung

der Glucoseassimilation zur Folge haben. Eine Erhönung der $NADPH_2$-Konzentration, wie sie unter Photoreduktionsbedingungen besonders bei hohen Lichtintensitäten auftreten kann, könnte dann zu einer Beschleunigung des ATP-Transportes führen, was bei Anwesenheit von Glucose eine erhöhte Aufnahmerate bewirken sollte. Dieses Denkmodell könnte die in allen Experimenten, in denen Glucoseaufnahme und CO_2-Fixierung simultan gemessen wurden, gefundene, im Gegensatz zur Kontrolle erhöhte Glucoseaufnahmerate bei 11 000 Lux erklären (Tab.2).

2. Wirkung von DCMU und Antimycin A auf die Photoassimilation von Glucose und die Photoreduktion

Als ein typisches Merkmal der zyklischen Photophosphorylierung wird allgemein ihre Unempfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen der zweiten Lichtreaktion, insbesondere CMU und DCMU betrachtet. So ist z.B. die zyklische Photophosphorylierung in Chloroplasten mit PMS, Vitamin K und FMN als Cofaktoren DCMU-unempfindlich (Losada und Arnon 1963). Daneben gibt es jedoch Hinweise, die für eine zweite DCMU-Hemmstelle im Bereich der ersten Lichtreaktion sprechen. Nach Asahi und Jagendorf (1963) wird die Pyocyanin-abhängige zyklische Photophosphorylierung in Chloroplasten durch sehr hohe CMU-Konzentrationen (10^{-4} M) gehemmt. Wie schon in der Einleitung erwähnt, schlossen Tanner et al. (1965, 1966) aus der Hemmbarkeit der anaeroben Glucoseassimilation von Chlorella durch hohe DCMU-Konzentrationen auf eine zweite DCMU-Hemmstelle in der zyklischen Photophosphorylierung in vivo.

Wie DCMU bei hohen Konzentrationen, so hemmt auch Antimycin A die Glucoseassimilation von Chlorella. Dieses Antibiotikum, das Cytochrom b in der Atmungskette blockiert (Chance und Williams 1956), hemmt nach Tagawa et al. (1963) die Ferredoxin-katalysierte zyklische Photophosphorylierung in Chloroplasten, was sie veranlaßte, Cytochrom b_6 als Elektronencarrier zwischen Ferredoxin und Pigmentsystem I zu setzen.

Gegen eine spezifische Wirkung von Antimycin A auf den zyklischen Elektronentransport sprechen Versuche von Dilley und Vernon (1964), die Antimycin A eine Entkopplerwirkung zuschreiben. Nach Izawa et al. (1967) hemmt Antimycin A bei niedrigen Lichtintensitäten auch die Ferricyanid-abhängige nichtzyklische Photophosphorylierung. Die $^{14}CO_2$-Fixierung von Chlorella erwies sich jedoch als Antimycin A-unempfindlich (Tanner et al. 1966), was eine spezifische Wirkung des Giftes auf die zyklische Photophosphorylierung vermuten läßt, wie sie von Arnon et al. (1967) beschrieben wird.

Eine spezifische Wirkung von Antimycin A und eine Beeinflussung der zyklischen Photophosphorylierung durch hohe DCMU-Konzentrationen sollte sich auch bei der anaeroben Glucoseassimilation und der Photoreduktion von Scenedesmus zeigen.

2.1 Anaerobe Photoassimilation von Glucose

Aus den Werten der Tabelle 3 geht hervor, daß auch die anaerobe Glucoseassimilation von Scenedesmus obliquus DCMU- und Antimycin A-empfindlich ist.

Tab.3: Wirkung von DCMU und Antimycin A auf die anaerobe Photoassimilation von Glucose durch Scenedesmus Wildtyp

	Giftkonzentration M	Glucoseaufnahme im Licht $\frac{mg}{mgChl.xh}$	% der Kontrolle %
DCMU	---	2,94	---
	$3x10^{-5}$	1,11	38
	$6x10^{-5}$	0,95	32
Antimycin A	---	2,72	---
	$1,3x10^{-4}$	1,46	54
	$2,6x10^{-4}$	1,26	46

Alle Werte sind Mittelwerte aus 2 Parallelproben.

Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit denen von Tanner et al. (1966) an Chlorella gefundenen überein, auch mit der sehr hohen DCMU-Konzentration von $6x10^{-5}$ M liegt die Hemmung nur zwischen 60 und 70%, die maximale Hemmung durch Antimycin A liegt mit 54% etwas niedriger. Ähnlich fanden Butt und Peel (1963) eine Hemmung der lichtabhängigen Glucoseaufnahme von Chlorella durch DCMU. Ebenso wird der lichtstimulierte Glucose ^{14}C-Einbau in Blätter durch CMU verringert (Marré et al. 1963). Daneben erwiesen sich auch andere Prozesse, die von der zyklischen Photophosphorylierung abhängen, als DCMU-empfindlich, so der ^{32}P-Einbau in Ankistrodesmuszellen, der auch durch Antimycin A gehemmt wird (Urbach und Simonis 1964) und die Phosphataufnahme in Polyphosphatfraktionen von Scenedesmus (van Rensen 1971). Diese Befunde lassen alle auf eine DCMU-Hemmstelle in der zyklischen Photophosphorylierung in vivo schließen, es war deshalb sehr überra-

Tab.4: Wirkung von DCMU und Antimycin A auf die anaerobe Photoassimilation von Glucose durch Scenedesmus 11

	Giftkonzentration M	Glucoseaufnahme im Licht $\frac{mg}{mgChl.xh}$	% der Kontrolle %	Zahl der Versuche
DCMU	---	1,15	---	3
	$5x10^{-6}$	1,13	98	2
	$1x10^{-5}$	1,15	100	3
	$3x10^{-5}$	1,14	99	3
	$6x10^{-5}$	1,24	108	4
Antimycin A	---	1,3	---	6
	$1,3x10^{-4}$	1,13	87	2
	$2,6x10^{-4}$	1,26	97	6

Die Werte sind Mittelwerte aus der angegebenen Zahl von Versuchen.

schend, daß die anaerobe Glucoseassimilation der Scenedesmusmutante 11 völlig DCMU- und Antimycin A-unempfindlich ist (Tab.4).

Auf Grund dieser Tatsache muß angenommen werden, daß die Mutante 11 eine andere zyklische Photophosphorylierung als der Wildtyp besitzt. Möglicherweise sind beim Wildtyp zwei zyklische Photophosphorylierungswege vorhanden, von denen bei der Mutante 11 einer ausgefallen ist. Der zyklische Elektronentransportweg der Mutante 11 dürfte, wenn Cytochrom b_6 die Hemmstelle des Antimycins ist, diesen Cofaktor nicht enthalten, ebenso müßte bei ihm die DCMU-empfindliche Stelle fehlen. Diese könnte mit der von Antimycin A identisch sein, da nach Ergebnissen von Mukasa et al. (1966) an Hefen, DCMU auch Elektronentransporte über Cytochrome blockieren kann. Hinweise für zwei zyklische Photophosphorylierungswege beim Wildtyp sind möglicherweise auch die im Gegensatz zur Mutante 11 größere Glucoseaufnahmerate bei nicht sättigenden Lichtintensitäten (Tanner et al. 1967) und die nicht völlige Hemmbarkeit, sowohl durch hohe Konzentrationen von DCMU als auch von Antimycin A. Sind diese Überlegungen auch nur hypothetischer Natur, so war es doch interessant, daß auch in einer Chlamydomonasmutante durch spektroskopische Messungen zwei zyklische Elektronentransportwege gefunden wurden (Hiyama et al. 1970). Ferner konnten Böhme et al. (1971) an Chloroplasten eine PMS-katalysierte zyklische Photophosphorylierung beschreiben, die bei Zugabe des Plastochinon-Antagonisten Dibromothymochinon Antimycin A-empfindlich wird. Das bedeutet, daß die PMS-katalysierte, über Plastochinon laufende zyklische Photophosphorylierung Antimycin A-unempfindlich ist. Stellt man diese Überlegungen für Scenedesmus an, so müßte der Wildtyp sowohl eine Plastochinon- als auch eine Cytochrom b- abhängige zyklische Photophosphorylierung vollziehen können. Die Mutante 11 sollte dann nur noch die Plastochinon-abhängige besitzen, was jedoch nicht sicher ist, da die Mutante 11 nach Bishop und Wong (1971) nur noch wenig Plastochinon enthält.

Ob die Vorstellung von zwei zyklischen Photophosphorylierungswegen in vivo nun richtig ist oder nicht, ein so deutlicher Unterschied in der Empfindlichkeit der anaeroben Photoassimilation von Glucose und damit der zyklischen Photophosphorylierung von Wildtyp und Mutante 11 gegenüber DCMU und Antimycin A, sollte sich auch in der Lichtreaktion I-abhängigen Photoreduktion zeigen.

2.2 Photoreduktion

a. DCMU

Nach Bishop (1958) ist die Photoreduktion bei Scenedesmus D_3 DCMU-unempfindlich. Bishop verwendete DCMU-Konzentrationen bis $3x10^{-6}$ M, es sollte deshalb eine noch höhere Konzentration erprobt werden. Als Kontrolle diente eine Probe ohne DCMU. Bei 1750 Lux bleibt diese im Falle des Wildtyps relativ lange Hydrogenasestabil. Gleichzeitig ist bei dieser niedrigen Intensität eine Verringerung der Hemmung, wie sie bei der Glucoseassimilation bei höheren Intensitäten auftritt (Tanner et al. 1965), nicht zu erwarten.

Tab.5: Wirkung von DCMU auf die Photoreduktion von Scenedesmus Wildtyp und Mutante 11

	Scenedesmus Wildtyp		Scenedesmus 11	
DCMU-Konzentration M	CO_2-Fixierung $\frac{\mu Mol\ CO_2}{mgChl.xh}$	% der Kontrolle %	CO_2-Fixierung $\frac{\mu Mol\ CO_2}{mgChl.xh}$	% der Kontrolle %
---	7,1	---	2,3	---
10^{-6}	5,8	82	2,4	104
$6x10^{-5}$	5,8	82	2,5	108

Lichtintensität 1750 Lux, alle Werte sind Mittelwerte aus zwei Parallelproben.

Nach Tabelle 5 wird die Photoreduktion des Scenedesmus Wildtyp, im Gegensatz zur Photoassimilation von Glucose und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Bishop (1958), von DCMU nur geringfügig beeinflußt. Bei der sehr hohen DCMU-Konzentration von 6×10^{-5} M nur zu 18%. Die Photoreduktion der Mutante 11 ist nach den Werten der Tabelle 5 völlig DCMU-unempfindlich. Die unterschiedlichen Kontrollraten von Wildtyp und Mutante 11 in diesen beiden Experimenten könnten als Übereinstimmung zu den unterschiedlichen Glucoseaufnahmeraten, wie sie aus Ergebnissen von Tanner et al. (1967) und aus Tabelle 3 und 4 hervorgehen, gewertet werden. Um hier jedoch eine klare Aussage machen zu können, muß eine größere Zahl von Daten verglichen werden.

Tab.6: Durchschnittliche Photoreduktions- und Glucoseassimilationsraten von Scenedesmus Wildtyp und Mutante 11

	Photoreduktion		Anaerobe Glucoseaufnahme im Licht	
	$\frac{\mu Mol\ CO_2}{mgChl.xh}$	Zahl der Versuche	$\frac{\mu Mol\ Glucose}{mgChl.xh}$	Zahl der Versuche
1750 Lux				
Scenedesmus WT	7,5	9	16,7	5
Scenedesmus 11	6,3	9	8,35	5
7000 Lux				
Scenedesmus WT	13,5	11	---	---
Scenedesmus 11	12,5	11	---	---

Im Gegensatz zur Glucoseassimilation findet sich nach Tabelle 6 kein besonderer Unterschied zwischen der Photoreduktionsrate von Scenedesmus Wildtyp und Mutante 11, sowohl in der Sättigung bei 7000 Lux als auch

bei 1750 Lux. Bei 1750 Lux ist die CO_2-Fixierungsrate der Mutante gegenüber dem Wildtyp nur etwa um 15% vermindert, die anaerobe Glucoseaufnahme im Licht dagegen um 50%. Bishop (1962) und Bishop und Wong (1971) finden, verglichen mit dem Wildtyp sogar eine etwas höhere Photoreduktionsrate bei der Mutante 11.

Sowohl in Bezug auf die CO_2-Fixierungsrate der Photoreduktion, als auch auf die Empfindlichkeit gegenüber DCMU bei sehr hohen Konzentrationen besteht kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante 11. Es war deshalb interessant, ob sich dieser Gegensatz zur Glucoseassimilation auch bei der Wirkung von Antimycin A zeigt.

b. Antimycin A

Aus Abb.6 geht hervor, daß dieses Gift die Photoreduktion des Scenedesmus Wildtyp nur von Anfang an blokkiert, wenn es vor der Adaptation der Hydrogenase zugegeben wird. Bei Zugabe 10 Minuten vor der Belichtung der Algensuspension ist der Druckabfall über 50 Minuten mit dem der Kontrolle identisch, erst dann tritt Verringerung der CO_2-Fixierungsrate und Deadaptation, d.h. Übergang zur Sauerstoffentwicklung, ein. Dieses Ergebnis kann zweierlei bedeuten:

- Einmal könnte die Hemmung der Photoreduktion bei Zugabe von Antimycin A vor der Adaptation für eine tatsächliche Blockierung der zyklischen Photophosphorylierung sprechen. Die Verringerung des Druckabfalls nach 50 Minuten bei Zugabe des Giftes kurz vor der Belichtung müßte dann allerdings bedeuten, daß dieses erst nach 50 Minuten den Hemmort erreicht.

- Zum anderen könnte die anfänglich gleiche CO_2-Fixierungsrate wie in der Kontrolle, bei Giftzugabe kurz vor der Belichtung, gegen eine Hemmung der zyklischen Photophosphorylierung sprechen. Antimycin A hätte dann nur eine hemmende Wirkung auf die Hydrogenase-Entwicklung und Stabilität. Dafür spricht auch die im Gegen-

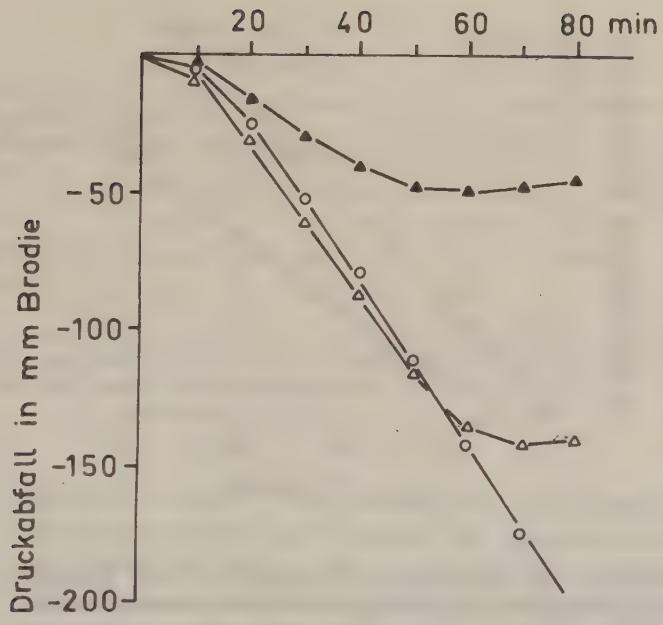

Abb.6: Wirkung von Antimycin A auf die Photoreduktion von Scenedesmus Wildtyp

Lichtintensität 1750 Lux
○ Kontrolle kein Gift ▲ Antimycin A ($2{,}6 \times 10^{-4}$ M) vor der Adaptation zugegeben △ Antimycin A ($2{,}6 \times 10^{-4}$ M) kurz vor Belichtung zugegeben

satz zur Kontrolle in beiden Giftproben auftretende Deadaptation.

Um diese Frage entscheiden zu können, wurde an der anaeroben Photoassimilation von Glucose des Scenedesmus Wildtyp, die nach Tabelle 3 Antimycin A-empfindlich ist, geprüft, ob dieses Gift von Anfang an hemmend wirkt. Dazu wurde es kurz vor der 10-minütigen Begasung mit N_2 zur Algensuspension gegeben.

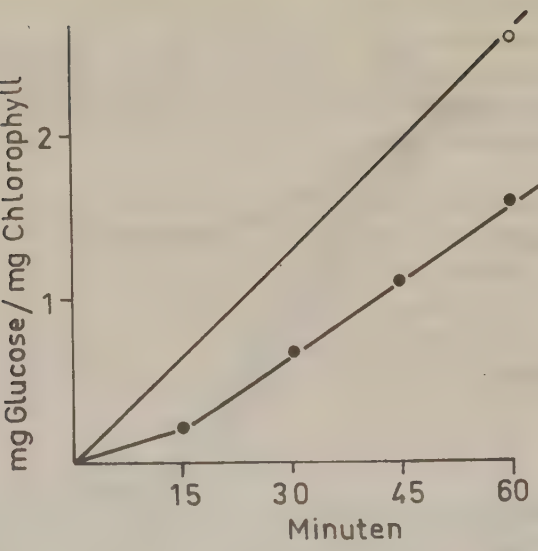

Abb.7: Kinetik der Antimycin A-Wirkung auf die anaerobe Photoassimilation von Glucose beim Scenedesmus Wildtyp

Lichtintensität 1750 Lux
○ Kontrolle kein Gift ● Antimycin A ($2{,}6 \times 10^{-4}$ M)

Nach Abb.7 blockiert Antimycin A die anaerobe Glucoseassimilation von Anfang an, die Hemmung ist sogar in den ersten 15 Minuten am stärksten. Es muß deshalb angenommen werden, daß Antimycin A außer einer Beeinflussung der Hydrogenaseaktivierung und Stabilität keine Wirkung auf die Photoreduktion des Wildtyp hat. Dies geht auch aus Versuchen hervor, in denen die Wirkung von Antimycin A auf DCMU-stabilisierte Zellen geprüft wurde (Tab.7). Hier fand sich nur eine geringfügige Hemmung von 13%.

Daneben zeigen die Werte von Spalte 4 und 5 der Tabelle 7, daß Antimycin A wie DCMU auch keinerlei Einfluß auf die Photoreduktion der Mutante 11 ausübt.

Tab.7: Wirkung von Antimycin A auf die Photoreduktion von Scenedesmus Wildtyp und Mutante 11

	Scenedesmus WT 10^{-6}M DCMU		Scenedesmus 11 kein DCMU	
Antimycin A Konzentration	$\frac{\mu Mol\ CO_2}{mgChl.xh}$	% der Kontrolle	$\frac{\mu Mol\ CO_2}{mgChl.xh}$	% der Kontrolle
---	7,3	---	5,5	---
$1,3x10^{-4}$M	6,45	88,5	5,7	104
$2,6x10^{-4}$M	6,3	86,5	5,8	105,5

Lichtintensität 1750 Lux, alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 2 Parallelproben.

Nach 2.2 a. und b. ist im Gegensatz zur anaeroben Photoassimilation von Glucose, die Photoreduktion des Scenedesmus Wildtyp DCMU- und Antimycin A-unempfindlich. Daneben findet sich kein gravierender Unterschied in der Photoreduktionsrate sowohl bei 1750 Lux als auch in der Sättigung bei 7000 Lux zwischen Wildtyp und Mutante 11. Vergleicht man die Photoreduktions- und Glucoseassimilationsraten von Wildtyp und Mutante 11 bei 1750 Lux, so ergibt sich nach Tabelle 6, bei einem ATP-Bedarf von je 3 µMol pro fixiertem µMol CO_2 und aufgenommenem µMol Glucose zwischen der Photoreduktion des Wildtyp mit 22,5 µMol ATP, der Photoreduktion der Mutante 11 mit 19 µMol ATP und der Glucoseassimilation der Mutante 11 mit 25 µMol ATP, kein großer Unterschied in der Energieausbeute. Für die Glucoseassimilation des Wildtyp errechnet sich bei dieser Intensität jedoch mit 50 µMol ATP eine doppelt so große Energieausbeute. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, daß die Photoreduktion von Scenedesmus Wildtyp und Mutante 11 und die Glucoseassimilation der Mutante von derselben zyklischen Photophosphorylierung betrieben wird. Bei der anaeroben Glucoseassimilation des Wildtyp muß ir-

gendeine zusätzliche "Energiequelle" im Spiel sein, die im Gegensatz zur Mutante die höhere Glucoseaufnahmerate des Wildtyp bewirkt und möglicherweise durch Antimycin A und DCMU gehemmt wird. Die zusätzliche Energiequelle kann beim Wildtyp offensichtlich zur Photoreduktion nicht verwendet werden, denn sonst sollte auch sie DCMU- und Antimycin A-empfindlich sein, außerdem sollte sich ein stärkerer Anstieg zumindest im linearen Teil der Lichtsättigungskurve der Photoreduktion des Wildtyp ergeben. Es wäre möglich, daß diese zusätzliche Energie außerhalb des Chloroplasten entsteht, z.B. in einer durch endogen entwickelten Sauerstoff angekurbelten oxidativen Phosphorylierung. Eine zweite zyklische Photophosphorylierung beim Wildtyp, wie sie unter 2.2 a. postuliert wurde, kann zwar bei einer Limitierung der Glucoseassimilation durch den ATP-Transport durch die Chloroplastenmembran (1.2 b.) einen steileren Anstieg der Sättigungskurve der Glucoseassimilation im Licht-limitierten Teil verursachen, jedoch kein höheres Plateau zur Folge haben. Mit einer oxidativen Phosphorylierung ließe sich dieses höhere Plateau bei der Glucoseassimilation des Wildtyp jedoch besser erklären. Wird endogen Sauerstoff entwickelt, so könnte natürlich daneben auch eine pseudozyklische Photophosphorylierung ablaufen. In diesem Zusammenhang war es von Interesse, daß allein durch das Weglassen von Pyrogallol (siehe Methodik) eine beträchtliche Steigerung der anaeroben Photoassimilation von Glucose bei Chlorella zu beobachten ist (Klob persönl. Mitteilung). In den Glucoseassimilationsversuchen dieser Arbeit war zwar immer Pyrogallol im Seitenkipper der Gefäße anwesend, es ist jedoch nicht bekannt, ob es endogen entwickelten Sauerstoff so rasch entfernen kann, daß keinerlei pseudozyklische und oxidative Phosphorylierung möglich ist. Da diese beiden Phosphorylierungsarten in diesem Fall Folgen eines nichtzyklischen Elektronentransportes sind, werden sie natürlich durch DCMU blockiert. Unerklärlich ist jedoch, daß zur maximalen Hemmung wesentlich höhere

DCMU-Konzentrationen nötig sind, als zur vollständigen Blockierung der photosynthetischen CO_2-Fixierung (Tanner et al. 1966). Die Antimycin A-Hemmung könnte auf einer Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung beruhen, da nach Tanner et al. (1965) auch die aerobe Glucoseaufnahme von Chlorella im Dunkeln durch hohe Antimycin A-Konzentrationen stark gehemmt wird.

D. SCHLUSSBETRACHTUNG

Da die Ergebnisse der einzelnen Versuche bereits an Ort und Stelle diskutiert wurden, sollen im Rahmen dieser Schlußbetrachtung nur noch einmal kurz die wesentlichen Punkte dieser Arbeit aufgezeigt werden und die in der Einleitung formulierten Fragen beantwortet werden.

Nach den beschriebenen Ergebnissen zeigt die frühe Lichtsättigung der anaeroben Glucoseassimilation im Gegensatz zur Vermutung von Tanner et al. (1969) nicht die tatsächliche Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung. Dies ergab sich einmal aus der Tatsache, daß die Photoreduktionshemmung durch Glucose bei der Mutante 11 beim Übergang von für die Glucoseassimilation gerade sättigenden Intensitäten zu höheren Intensitäten, bei nicht nur gleichbleibender, sondern sogar erhöhter Glucoseaufnahmerate vermindert werden kann. Zum anderen errechnet sich für die CO_2-Fixierung in der Photoreduktion bei 11 000 Lux ein wesentlich höherer Energiebedarf als für die anaerobe Glucoseaufnahme in sättigender Lichtintensität bei 1770 Lux.

Die Frage nach der tatsächlichen Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung in vivo bleibt allerdings unbeantwortet, da die spätere Sättigung der Photoreduktion immer noch eine Limitierung durch die Hydrogenaseaktivität oder Dunkelreaktionen im CO_2-Fixierungsmechanismus beinhalten könnte. Sie liegt jedoch sicher bei höheren Lichtintensitäten als die Sättigung der anaeroben Glucoseassimilation. Wenn auch der Vergleich zwischen in vivo und in vitro Daten nicht ganz stichhaltig ist, so ist es doch in diesem Zusammenhang interessant, daß die Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung in Chloroplasten schon immer wesentlich höher lag als die der anaeroben Photoassimilation von Glucose, z.B. mit PMS als Cofaktor über 50 000 Lux (Arnon 1961), mit Pyocyanin bei 7000 Lux (Batra und Jagendorf 1965) und mit Ferredoxin bei 30 000 Lux (Arnon et al. 1967).

Die anaerobe Photoassimilation von Glucose scheint in ihrer Sättigung durch den ATP-Transport durch die Chloroplastenmembran limitiert zu sein, da eine Begrenzung durch den Glucosetransport in die Zelle oder durch die enzymatische Umwandlung in Oligo- und Polysaccharide nicht in Frage kommt. Dieser ATP-Transport ist möglicherweise von der $NADPH_2$-Konzentration abhängig.

Nachdem die anaerobe Photoassimilation von Glucose sicher nicht Indikator für die Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung in vivo ist, kann die frühe Lichtsättigung dieses Prozesses nicht länger als Kriterium gegen eine stöchiometrische Beteiligung der zyklischen Photophosphorylierung an der photosynthetischen CO_2-Fixierung gewertet werden.

Nachdem sich sowohl die Photoreduktion des Scenedesmus Wildtyp und der Mutante 11 als auch die anaerobe Glucoseaufnahme der Mutante, im Gegensatz zur Glucoseassimilation des Wildtyp, als Antimycin A- und DCMU-unempfindlich erwiesen, muß die Vorstellung einer Wirkung von DCMU und einer spezifischen von Antimycin A auf "die zyklische Photophosphorylierung", wie sie mehrfach beschrieben wird (Tanner et al. 1965, 1966, Arnon et al. 1967), revidiert oder zumindest differenziert werden. Zwei Möglichkeiten stehen zur Diskussion:

1. DCMU und Antimycin A hemmen tatsächlich eine zyklische Photophosphorylierung. Die Scenedesmusmutante 11 müßte dann eine zusätzliche und zwar DCMU- und Antimycin A-unempfindliche zyklische Photophosphorylierung besitzen. Für die Existenz von zwei zyklischen Photophosphorylierungswegen beim Wildtyp, von denen einer mit dem der Mutante identisch sein könnte, sprechen möglicherweise die nicht völlige Hemmbarkeit der anaeroben Glucoseassimilation des Wildtyp durch beide Gifte (maximale Hemmung nur bis 60%) und die größere Glucoseaufnahmerate des Wildtyp im lichtlimitierten Bereich der Sättigungskurve. Das, im Unterschied zur Mutante doppelt so hohe Plateau der Glucoseassimilation des Wildtyp in der Sät-

tigung kann jedoch bei einer Limitierung der anaeroben Glucoseassimilation durch den ATP-Transport durch die Chloroplastenmembran, durch zwei zyklische Photophosphorylierungswege nicht erklärt werden. Außerdem ist unklar, warum zwei zusammen mehr Energie liefernde zyklische Photophosphorylierungen beim Wildtyp nicht auch eine erhöhte Photoreduktionsrate, zumindest im Licht-limitierten Bereich zur Folge haben. In der Sättigung der Photoreduktion müßte dies nicht unbedingt der Fall sein, da sie, wie schon gesagt, eine Limitierung durch den CO_2-Fixierungsmechanismus oder die Hdrogenaseaktivität wiederspiegeln könnte.

2. DCMU und Antimycin A hemmen die zyklische Photophosphorylierung nicht. Der Wildtyp und die Mutante 11 besitzen beide dieselbe zyklische Photophosphorylierung. Die Hemmung der anaeroben Glucoseassimilation des Wildtyps durch DCMU und Antimycin A beruht auf der Beeinträchtigung einer pseudozyklischen und daneben möglicherweise einer oxidativen Phosphorylierung, die durch endogen entwickelten Sauerstoff hervorgerufen werden könnte. Eine zusätzliche oxidative Phosphorylierung beim Wildtyp kann, da die anaerobe Glucoseassimilation in der Sättigung durch den ATP-Transport durch die Chloroplastenmembran limitiert ist, das im Gegensatz zur Mutante 11 erhöhte Plateau des Wildtyp erklären, da sie nicht im Chloroplasten abläuft. Es war in diesem Zusammenhang von großem Interesse, daß nach Ullrich (1971) bei Ankistrodesmus auch unter anaeroben Bedingungen bei Abwesenheit von CO_2 eine Sauerstoffentwicklung meßbar ist. Diese endogene O_2-Entwicklung ist sehr früh gesättigt, bei pH 5,6 schon bei 1000 Lux und tritt nur auf, wenn Nitrat im Medium vorhanden ist. Nach 5-stündiger Nitratverarmung ist diese O_2-Entwicklung stark reduziert. Ullrich vermutet, daß für diese frühe Lichtsättigung nicht die Photosysteme, sondern die Nitratreduktion begrenzend wirkt. Eine völlige Blockierung der O_2-Entwicklung wird

erst mit 10^{-5} M - DCMU erreicht, bei derselben Konzentration ergibt sich die maximale Hemmung der ^{32}P-Markierung. Der Restbetrag an ^{32}P-Einbau soll durch zyklische Photophosphorylierung verursacht werden. Diese an Ankistrodesmus mit der ^{32}P-Markierung gemachten Beobachtungen zeigen, abgesehen von ihrer Nitratabhängigkeit, eine frappierende Ähnlichkeit zu denen, in dieser Arbeit am Scenedesmus Wildtyp für die Glucoseaufnahme gefundenen (maximale, aber nicht völlige Hemmbarkeit der anaeroben Glucoseassimilation erst bei sehr hohen DCMU-Konzentrationen). Bei den Glucoseassimilationsexperimenten war zwar kein Nitrat im Medium vorhanden, es wurde jedoch nicht getestet, inwieweit die Algenzellen an Nitrat verarmt waren, zum anderen laufen neben der Nitratreduktion auch andere $NADPH_2$-verbrauchende Prozesse in Algenzellen noch unter CO_2-Mangel ab, z.B. die lichtabhängige Reduktion von gespeicherten oder von außen gebotenen Konlenhydraten zu Fettsäuren (Paschinger 1969). Unter Glucoseassimilationsbedingungen könnten solche $NADPH_2$-verbrauchende Vorgänge einen nichtzyklischen Elektronentransport, daneben eine nichtzyklische Photophosphorylierung und als Folge eine O_2-Entwicklung aufrecht erhalten. Diese $NADPH_2$-verbrauchenden Prozesse dürften wie die Nitratreduktion bei Ankistrodesmus den nichtzyklischen Elektronentransport und damit die O_2-Entwicklung des Scenedesmus Wildtyp limitieren, da sonst die anaerobe Glucoseassimilation des Wildtyp auch über ihr erhöntes Plateau hinaus beim Übergang zu höheren Lichtintensitäten ansteigen sollte. Da unter Photoreduktionsbedingungen $NADPH_2$ möglicherweise in ausreichender Menge vorhanden ist, um zusätzliche $NADPH_2$-verbrauchende Prozesse abzusättigen, könnte der nichtzyklische Elektronentransport auf ein Minimum beschränkt sein. Das würde heißen, daß unter Photoreduktionsbedingungen keine zusätzliche oxidative Phosphorylierung stattfindet und erklärt dann einmal gleiche Photoreduktionsraten beim Wildtyp und bei der Mutante 11, zum anderen die Unempfind-

lichkeit der Photoreduktion des Wildtyp gegenüber DCMU und Antimycin A.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Sättigung der anaeroben Photoassimilation von Glucose liegt sowohl beim Scenedesmus Wildtyp als auch bei der Mutante 11 zwischen 1500 und 2000 Lux. Die Photoreduktion ist dagegen in beiden Fällen wesentlich später zwischen 5000 und 7000 Lux gesättigt.

2. Die Lichtsättigungskurve der Photosynthese des Scenedesmus Wildtyp biegt erst bei 7500 Lux um und steigt bis 11 000 Lux noch geringfügig an.

3. Der Scenedesmus Wildtyp nimmt aerob im Dunkeln stets mehr Glucose (15%) auf als anaerob in sättigender Lichtintensität. Eine Limitierung der anaeroben Glucoseaufnahme in der Sättigung durch den Glucosetransport in die Zelle ist demnach unwahrscheinlich.

4. Glucose hemmt die Photoreduktion von Scenedesmus 11 bei 1770 Lux stark (65%), bei 11 000 Lux findet sich eine Verringerung, jedoch keine vollständige Aufhebung dieser Hemmung. Die gehemmte CO_2-Fixierungsrate ist bei 11 000 Lux etwa 3,5 mal größer als bei 1770 Lux. Die simultan verfolgte Glucoseaufnahme ist bei 1770 Lux mit der Kontrollrate unter N_2 identisch. Letztere ist bei dieser Intensität gesättigt, die Glucoseaufnahme bei gleichzeitig möglicher Photoreduktion erhöht sich dagegen beim Übergang von 1770 zu 11 000 Lux noch um 25%. Diese Ergebnisse zeigen, daß die zyklische Photophosphorylierung auch über 1770 Lux hinaus Energie zur Verfügung stellen kann. Die frühe Lichtsättigung der anaeroben Photoassimilation von Glucose zeigt demnach nicht die tatsächliche Sättigung der zyklischen Photophosphorylierung in vivo.

5. Nachdem eine Limitierung der anaeroben Photoassimilation von Glucose durch den Glucosetransport in die Zelle oder durch enzymatische Reaktionen, die zur Bildung von Oligo- und Polysacchariden führen, nicht in Frage kommt, wird die

frühe Lichtsättigung der anaeroben Glucoseassimilation sehr wahrscheinlich durch den ATP-Transport durch die Chloroplastenmembran verursacht. Die bei gleichzeitig ablaufender Photoreduktion bei 11 000 Lux gefundene Erhöhung der Glucoseaufnahmerate wird als in vivo Hinweis für das von Heber und Santarius (1970) postulierte Modell eines indirekten ATP-Transportes, an dem $NADPH_2$ beteiligt ist, gewertet.

6. Die anaerobe Photoassimilation von Glucose des Scenedesmus Wildtyp wird durch DCMU und Antimycin A gehemmt. Die maximale Hemmung liegt jedoch auch bei den sehr hohen Giftkonzentrationen von 6×10^{-5} M für DCMU und $2{,}6 \times 10^{-4}$ M für Antimycin A nicht höher als 60%. Im Gegensatz zum Wildtyp ist die Glucoseassimilation der Mutante 11 völlig DCMU- und Antimycin A-unempfindlich.

7. DCMU- und Antimycin A-unempfindlich ist auch die Photoreduktion sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante 11.

8. Die durchschnittliche anaerobe Glucoseaufnahmerate des Scenedesmus Wildtyp im Licht ist bei gleicher Lichtsättigung etwa doppelt so groß wie die der Mutante 11. Im Gegensatz dazu ergab sich kein großer Unterschied in den Photoreduktionsraten von Wildtyp und Mutante 11. Das erhöhte Plateau der anaeroben Glucoseaufnahme beim Wildtyp wird mit einer zusätzlichen, durch endogen entwickelten Sauerstoff hervorgerufenen, oxidativen Phosphorylierung erklärt, die DCMU- und Antimycin A-empfindlich ist und unter Photoreduktionsbedingungen möglicherweise nicht auftritt.

Teil II

Regulation der Glykolyse durch zyklische Photophosphorylierung

A. EINLEITUNG

Seit langem ist bekannt, daß Licht die Pflanzenatmung beeinflussen kann. Nach Rosenstock und Ried (1960) zeigen jedoch viele, der schon um die Jahrhundertwende gemachten Beobachtungen keine direkte Wirkung von Licht auf die Atmung. Die meisten damals gefundenen Effekte wurden wahrscheinlich durch reine physikalische Veränderungen verursacht, so z.B. Atmungssteigerungen als Folge einer Temperaturerhöhung durch Belichtung. Neuere Messungen, in denen solche Faktoren weitgehend ausgeschaltet wurden, haben gezeigt, daß beobachtete Veränderungen der Dunkel-Sauerstoffaufnahme oder CO_2-Entwicklung durch Licht nicht in jedem Fall eine Wirkung von Licht auf die "Mitochondrienatmung" (Dunkelatmung) widerspiegeln muß. So wurde von einer größeren Zahl von Forschern, darunter Decker (1955), Hew und Krotkov (1968), Joliffe und Tregunna (1968), Poskuta (1968), Tregunna et al. (1966) und Zelitch (1966), bei höheren Pflanzen ein Prozeß beschrieben, der durch eine beachtliche Steigerung der CO_2-Entwicklung im Licht gekennzeichnet ist und als "Photorespiration" bekannt wurde. Charakteristisch für die Photorespiration ist ein beim Licht-Dunkelübergang auftretender Abfall in der CO_2-Entwicklung zu einer Dunkelrate und eine Erhöhung des CO_2-Kompensationspunktes mit steigender Sauerstoffkonzentration. Die Abhängigkeit der Photorespiration von höheren O_2-Konzentrationen ist ein typischer Unterschied zur Dunkelatmung. Letztere ist bei 2% O_2 gesättigt und bei dieser Konzentration größer als die Photorespiration, die ihrerseits von 2% bis 100% O_2 weiter ansteigt (Forrester et al. 1966, Poskuta 1968, Tregunna et al. 1966). Die Hemmung der Photosyntnese durch Sauerstoff, der sogenannte Warburg-Effekt (Warburg 1920) wird der Photorespiration zugeschrieben (Gibbs 1969), die außerdem durch niedrige CO_2-Konzentrationen und hohe Lichtintensitäten gefördert wird. Nach Zelitch (1966) soll das Substrat der Photorespiration Glykolsäure sein. Dies ergab sich aus der Tatsache, daß auch die Glykolsäurebildung in gleicher Weise wie die photorespiratorische CO_2-Entwicklung durch hohe O_2- und niedrige CO_2-Konzentrationen gefördert

wird. Arbeiten von Wilson und Calvin (1955) an Scenedesmus, von Bassham und Kirk (1962) und Coombs und Wittingham (1966) an Chlorella zeigen eine enge Verknüpfung zwischen der Glykolatsynthese und dem CO_2-Fixierungsmechanismus der Photosynthese, der genaue Bildungsmechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Die im Licht in den Chloroplasten gebildete Glykolsäure wird nach Tolbert und Yamazaki (1969) in den Peroxisomen durch die Glykolsäureoxidase unter O_2-Verbrauch zu Glyoxylsäure umgewandelt. Aus Glyoxylsäure entsteht Glycin, aus dem dann in den Mitochondrien unter CO_2-Abgabe Serin gebildet werden soll. Daß die Substrate von Photorespiration und Dunkelatmung verschieden sind, konnte auch durch Versuche von Goldsworthy (1966) und Ludwig (1968) mit Blättern gezeigt werden. Danach ist die spezifische Aktivität des, nach einer vorherigen Photosyntheseperiode mit $^{14}CO_2$, in CO_2-freier Luft entwickelten Kohlendioxyds im Licht größer als im Dunkeln.

Hoch et al. (1963) fanden durch massenspektrographische Sauerstoffaustauschmessungen bei Anacystis eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme bei niedrigen Lichtintensitäten und eine Förderung bei höheren Intensitäten. Diese Förderung der Sauerstoffaufnahme nimmt wie die Photorespiration parallel zur Photosynthese mit steigender Lichtintensität zu. Sie scheint allerdings nicht durch Glykolsäureoxidation verursacht zu werden, da sie im Gegensatz zur Glykolatbildung auch bei sättigender CO_2-Konzentration auftritt (Jackson und Volk 1970). Hoch et al. (1963) ziehen eine im Licht gesteigerte Sauerstoff-verbrauchende pseudozyklische Photophosphorylierung durch Reoxidation von $NADPH_2$ durch O_2 mit gleichzeitiger Phosphorylierung in Betracht. Das dadurch zusätzlich gewonnene ATP soll das, bei einer P/2e-Rate von 1 für die nichtzyklische Photophosphorylierung, bei der photosynthetischen CO_2-Fixierung und beim Wachstum auftretende Energiedefizit ausgleichen (siehe auch Arnon et al. 1967). Die Hemmbarkeit dieser im Licht geförderten O_2-Aufnahme durch DCMU weist tatsächlich auf eine enge Verbindung dieses Effektes mit der photosynthetischen O_2-Entwicklung hin.

Durch DCMU nicht beeinflußt wird dagegen die von Hoch et al. (1963) bei Anacystis und von Govindjee et al. (1963) bei Chlorella gefundene Hemmung der O_2-Aufnahme bei niedrigen Intensitäten. Diese Blockierung der Sauerstoffaufnahme, die auch als Ursache für den sogenannten "Kok-Effekt" (Kok 1948) angesehen wird, soll nun auf einer tatsächlichen Beeinflussung der endogenen Dunkelatmung durch Licht beruhen, wobei Wellenlängen um 700 nm besonders wirksam waren. Diese Tatsache und die DCMU-Unempfindlichkeit lassen auf eine Beteiligung von Photosystem I an der O_2-Aufnahmehemmung schließen. Nach Ried (1968) beruhen die mit einer Sauerstoffelektrode gemessenen, nach Lichtblitzen im Dunkeln auftretenden Transients T_3 und T_4 im O_2-Austausch von Chlorella auf einer Hemmung der Atmung im Licht. Die frühe Lichtsättigung, die Unempfindlichkeit gegenüber DCMU und die besondere Wirksamkeit von Licht >690 nm lassen auch hier Photosystem I als Ursache für diese Transients als wahrscheinlich erscheinen. Zur selben Interpretation kommt auch Kowallik (1969 a), der in Chlorella bei DCMU-gehemmter Photosynthese und bei der Scenedesmusmutante 11, die nur noch Lichtreaktion I besitzt (Bishop 1962), eine Blockierung der Atmung durch Licht nachweisen konnte. Als Ursache dieser Lichthemmung wird allgemein eine zyklische Photophosphorylierung vermutet, die regulierend auf die Glykolyse einwirken könnte (Hoch et al. 1963, Ried 1968, Kowallik 1969 a). Ob das durch Veränderungen im Phosphatspiegel (Kandler und Haberer-Liesenkötter 1963) oder im ATP/ADP-Verhältnis (Santarius und Heber 1965) der Zelle erfolgen kann, soll an anderer Stelle diskutiert werden. Von Healey und Myers (1971) wird zum anderen auf Grund von Versuchen an Chlamydomonas die Vorstellung vertreten, daß der Kok-Effekt auf einer Atmungshemmung durch Konkurrenz von Photosystem I und der Atmungskette um $NADH_2$ beruhen könnte.

Neben dieser, bei Wellenlängen >680 nm am stärksten auftretenden Hemmung der endogenen Atmung wird eine spezifisch durch Blaulicht verursachte Atmungssteigerung beschrieben, die auf Grund verschiedener Merkmale sehr wahr-

scheinlich nichts mit der Photorespiration und einer pseudozyklischen Photophosphorylierung zu tun hat. Bereits 1943 fanden Emerson und Lewis im Rahmen von Photosynthesemessungen eine Steigerung der Sauerstoffaufnahmerate von Chlorella pyrenoidosa im Dunkeln nach Bestrahlung mit Blaulicht (480 nm) niedriger Intensitäten. Die O_2-Aufnahme nach der Belichtung war über mehrere Stunden größer als die Dunkelatmung vor der Belichtung. Ähnlich fanden Pickett und French (1967) und Ried (1968) nach kurzen Blaulichtblitzen eine Steigerung der O_2-Aufnahme im nachfolgenden Dunkeln. Das Aktionsspektrum dieser Effekte ist identisch mit dem von Kowallik (1967) für die Atmungssteigerung bei einer gelben Chlorellamutante gefundenen. Dieses Spektrum besitzt ein kleineres Maximum um 370 nm und ein Hauptmaximum um 460 nm. Rotlicht zeigte keinerlei fördernde Wirkung. Nach Kowallik (1967) ist diese nach einer Lagphase von mehreren Minuten auftretende Atmungsförderung der Chlorellamutante bereits bei 500 erg/cm^2·sec gesättigt. Außerdem konnte Kowallik zeigen, daß dieser Blaulichteffekt auf die Atmung auch im Wildstamm von Chlorella bei gleichzeitig ablaufender Photosynthese (Kowallik und Kowallik 1969) und bei DCMU-gehemmter Photosynthese (Kowallik 1969 a) nachgewiesen werden kann. Die extrem niedrige Lichtsättigung, die Unempfindlichkeit gegenüber DCMU und das Auftreten dieser Atmungssteigerung in einer gelben Chlorellamutante lassen eine Verbindung mit der Photosynthese, wie sie für die Photorespiration charakteristisch ist, als ausgeschlossen erscheinen. Die Blaulicht-abhängige Atmungssteigerung besitzt denselben respiratorischen Quotienten (RQ) von 1 und dieselbe Temperaturabhängigkeit wie die Dunkelatmung (Pickett 1967, Kowallik und Gaffron 1967), was eine tatsächliche Förderung der Dunkelatmung nahelegt. Ob Blaulicht dabei direkt auf die Atmung einwirkt oder indirekt über eine Umsteuerung des Zellstoffwechsels, die eine Atmungssteigerung durch eine stärkere Substratanlieferung zur Folge haben könnte, ist bislang noch nicht klar. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß von mehreren Autoren bei den verschiedensten pflanzlichen Organismen eine spezifisch durch Blaulicht ge-

förderte Proteinsynthese beschrieben wird, so für höhere Pflanzen von Voskresenskaja (1952) und Casper und Pirson (1965), für Farne von Mohr und Ohlenroth (1962) und für Algen von Pirson und Kowallik (1960, 1964) und von Kowallik (1962, 1966). Daneben ist auch völlig unklar, ob diese Atmungssteigerung in irgendeinem Zusammenhang mit der spezifisch morphogenetischen Wirkung von Blaulicht auf pflanzliche Organismen steht, z.B. wie bei Farnvorkeimen (Mohr und Ohlenroth 1962) und Acetabularia (Clauss 1968).

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit war es von besonderem Interesse, daß Blaulicht nach Kowallik und Gaffron (1967) auch die Gärung von Algen fördert. Kowallik (1969 b) findet für die Gärungssteigerung bei der genannten gelben Chlorellamutante anhand von pH-Messungen, dasselbe Aktionsspektrum wie für die Atmungssteigerung. Als Ursache für die Gärungssteigerung vermutet Kowallik eine durch Blaulicht geförderte Glykolatausscheidung, die unter aeroben Bedingungen zu einer Atmungssteigerung führen soll. Daten, die diese Vermutung stützen könnten, wurden allerdings nicht veröffentlicht.

Für Veränderungen der Atmungsaktivität pflanzlicher Organismen im Licht kommen nach den beschriebenen Ergebnissen der einzelnen Autoren recht unterschiedliche Ursachen in Frage. Einige Hinweise sprechen dafür, daß unter den Ursachen auch eine Beeinflussung der Glykolyse durch Licht möglich ist. Diese Hinweise gaben Anlaß für die nachfolgend beschriebenen Versuche dieser Arbeit. Eine Beeinflussung der Gärung von Scenedesmus durch Licht sollte sich in direkter Weise durch eine Hemmung oder Stimulierung der anaeroben Ausscheidung von typischen Gärungsprodukten einzelliger Algen, wie z.B. Milchsäure (Warburg et al. 1957, Syrett und Wong 1963) nachweisen lassen.

Die Frage nach einer Wirkung von Licht auf die Glykolyse war auch von großem Interesse für die in Teil I beschriebenen Untersuchungen zur zyklischen Photophosphorylierung, insbesondere für die Messung der anaeroben Photoassimilation von Glucose. Da Scenedesmus eine nicht zu vernachlässigende anaerobe Dunkel-

Glucoseaufnahme besitzt, bei der Mutante 11 macht diese bis zu 50% der Lichtaufnahme aus, stellte sich immer die Frage, inwieweit die Lichtaufnahme mit der Dunkelaufnahme korrigiert werden muß. Für den Vergleich von Glucoseaufnahme- und Photoreduktionsraten war dies von entscheidender Bedeutung. Die nachfolgend beschriebenen Versuche haben erbracht, daß die im Licht gemessene Glucoseaufnahme des Scenedesmus Wildtyp und der Mutante 11 bei sättigender Lichtintensität, auf Grund einer nahezu vollkommenen Blockierung der Glykolyse durch Licht, nicht korrigiert werden muß. Aus dieser Tatsache ergaben sich weitere interessante Fragen, die eingehender untersucht wurden.

B. MATERIAL und METHODEN

1. Versuchsobjekte und Anzuchtbedingungen

Neben Scenedesmus D_3 und Scenedesmus 11 wurde in diesem Teil der Arbeit noch die in der Einleitung von Teil I erwähnte Scenedesmusmutante 8 (Bishop 1963) untersucht. Anzuchtbedingungen siehe Teil I Material und Methoden.

2. Versuchsbedingungen

2.1 Versuche mit Weißlicht

Die Wirkung von Weißlicht auf die Bildung von Gärungsprodukten durch Scenedesmus wurde in der schon in Teil I beschriebenen Warburg-Apparatur von Braun Melsungen Typ SL 85 G durchgeführt. Die Experimente, in denen die Vergärung exogen gebotener Glucose bestimmt wurden, unterscheiden sich von den in Teil I beschriebenen Glucoseassimilationsversuchen weder im Ansatz noch in der Durchführung, sondern nur durch die Bestimmung zusätzlicher Parameter, wie Milchsäureausscheidung und pH-Verschiebung. Zur Bestimmung der endogenen Gärung, d.h. des anaeroben Abbaus gespeicherter Kohlenhydrate, waren die Zellen (300 mg Chlorophyll/ml) nur in Puffer suspendiert. Nach einer Gärzeit von 5 - 6 Stunden bei 28°C wurden die Algen abzentrifugiert und im Überstand je nach Art der Messung der pH, die Milchsäurekonzentration und Glucosekonzentration bestimmt. Die Warburgversuche boten noch den zusätzlichen Vorteil, daß nebenbei die alkoholische Gärung manometrisch verfolgt werden konnte.

2.2 Versuche mit monochromatischem Licht

a. Versuchsaufbau und Durchführung

Die Wirkung von monochromatischem Licht auf die Gärung von Scenedesmus wurde in Glasküvetten (10x28x 120 mm) bestimmt (Tanner et al. 1968). Der Boden der

Küvetten bestand zur Hälfte aus einer G-4-Fritte, durch die während der gesamten Versuchszeit ein starker Strom von nachgereinigtem Stickstoff in die Algensuspension geperlt wurde, was neben anaeroben Bedingungen auch eine ständige Durchmischung der Suspension gewährleistete. Vor Eintritt in die Küvette passierte der Stickstoff zunächst zur Wassersättigung zwei Waschflaschen mit destilliertem Wasser und zur Bestimmung und Konstanthaltung einer bestimmten Durchflußgeschwindigkeit Rotamesser vom Typ LO 25/14 der Firma Rota/Oelfingen. Durch Schlauchklemmen wurde für jede Küvette dieselbe Durchflußgeschwindigkeit von ca 3 l N_2/h einreguliert. Um die Flüssigkeitsverdunstung auf ein Minimum zu beschränken und das Eindringen von Luft zu verhindern, wurde die Küvettenöffnung während der Versuche mit einer Verschlußkappe bedeckt, die nur mit einer kleinen Austrittsöffnung für den Stickstoff versehen war. Aus demselben Grund wurde in der Regel eine kürzere Versuchszeit als bei den Warburgexperimenten gewählt (3 - 4 Stunden). Um dennoch gute Gärungsraten zu erhalten, mußten dickere Algensuspensionen verwendet werden. Da nicht in allen Experimenten dieselbe Algendichte angewandt wurde, wird sie jeweils bei den einzelnen Versuchen vermerkt.

Zur Konstanthaltung einer Temperatur von 28°C befanden sich die Küvetten in einem rechteckigen Plexiglaswasserbad Typ Extra-Therm P 5 der Firma Julabo. Nach 10 Minuten Begasung der Algensuspension (bis zu 12 ml Gesamtvolumen pro Küvette) mit Stickstoff im Dunkeln wurden aus allen Küvetten Nullproben entnommen und abzentrifugiert, gleichzeitig wurde in den "Lichtküvetten" das Licht eingeschaltet. Die Entnahme weiterer Proben erfolgte dann in den vermerkten Zeitabständen. In allen Versuchen diente als Bezugsgröße die Gärungsrate einer Dunkelkontrolle. Puffermolarität und Glucoseanfangskonzentration waren, wenn nicht anders vermerkt, dieselben wie in den Warburgversuchen.

b. Lichtquellen und Lichtmessung

Die Küvetten wurden einseitig durch Leitz-Projektoren Typ Prado 500 belichtet. Zur verkleinerten Abbildung der Projektorbildbühne dienten Sammellinsen, durch deren Verschiebung auf einer optischen Bank, je nach Algensuspensionsmenge ein entsprechend großes Lichtfeld eingestellt werden konnte.

Die Isolierung bestimmter Spektralbereiche und Wellenlängen erfolgte mit Farbgläsern und Interferenzfiltern (Halbwertsbreite max. 18 mμ) der Firma Schott & Gen.. Um bei monochromatischem Licht eine möglichst große spektrale Reinheit zu erhalten, wurden den Interferenzfiltern zusätzlich Farbgläser vorgeschaltet. Folgende Filterkombinationen kamen zur Anwendung: 454 nm + Blauglas Nr.28; 683 nm + Orangeglas Nr.3; 712 nm + Rotglas Nr. 695. Die Filter wurden unmittelbar vor der Projektorbildbühne aufgestellt.

Zur Einregulierung einer gewünschten Lichtintensität gab es drei Möglichkeiten, so die Verschiebung der Sammellinsen, das Einbringen von Neutralgläsern in den Strahlengang und die Regulierung der Lampenspannung über einen Drehwiderstand.

Die Lichtintensität wurde mit einem Siliziumphotoelement (1x2 cm) der Firma Dr.B.Lange Berlin direkt in der Küvette gemessen. Dieses Photoelement wurde dazu für jede Lichtqualität gegen eine Thermosäule der Firma Kipp und Zonen geeicht. Als Meßgerät diente ein Voltmeter der Firma Hewlett Packard Typ 419 A.

2.3 Versuche zur Wirkung von Licht auf Gärungszwischenstoffkonzentrationen

a. Versuchsaufbau und Durchführung

In einem 1 l Erlenmeyerkolben, der bis auf seine Grundfläche schwarz angestrichen war, wurden ca 50 ml einer Algensuspension (670 μg Chlorophyll/ml, Algen

in dest. H_2O suspendiert, Glucoseanfangskonzentration 13 mM) zunächst im Dunkeln mit wassergesättigtem nachgereinigtem Stickstoff begast. Der Erlenmeyerkolben war dazu mit einem zwei Bohrungen enthaltenden Gummistopfen verschlossen. Durch eine Bohrung wurde der Stickstoff mit einem spitz ausgezogenen Glasrohr in die Algensuspension geleitet, die zweite Bohrung diente als Austrittsöffnung. Während der ganzen Versuchszeit stand der Erlenmeyerkolben in einem Wasserbad (in Form einer Glaswanne) von 28°C. Nach einer Begasung von 45 Minuten unter häufigem Umschütteln der Suspension, wurde eine Dunkelprobe (10 ml) abpipettiert und sofort in Perchlorsäurelösung eingeblasen. Gleichzeitig wurde das Licht eingeschaltet und in den entsprechenden Zeitabständen Proben entnommen. Die Belichtung der Algensuspension erfolgte von unten durch das Wasserbad mit einer Phillips-Attraluxlampe (300 W). Die Lichtintensität betrug etwa 80 000 Lux in der Höhe des Erlenmeyerkolbenbodens. Diese hohe Intensität war zur Durchstrahlung der sehr dicken Algensuspension nötig.

b. Extraktion

Jeweils 10 ml Algensuspension wurden in 5 ml 20%ige Perchlorsäurelösung einpipettiert. Nach einer Stunde wurde abzentrifugiert, der Überstand abdekantiert und unter Eiskühlung mit einer 5 molaren K_2CO_3-Lösung das Perchlorat als $KClO_4$ ausgefällt. Eine vollständige Ausfällung war gewährleistet, wenn die Lösung einen pH-Wert zwischen 6 und 7 erreicht hatte. Das $KClO_4$ wurde abzentrifugiert und der gesamte Überstand im Rotationsverdampfer bei 40°C bis zur Trockne eingeengt. Die zurückbleibenden Salze wurden in 3 ml dest. H_2O gelöst, was sich nicht löste (überschüssiges K_2CO_3), wurde abzentrifugiert. Der Überstand konnte nun in die optischen Tests eingesetzt werden. Dieses Verfahren gewährleistete eine möglichst starke Konzentrierung der zu bestimmenden Substanzen. Ein

Blindversuch mit einer bestimmten Fructosediphosphatmenge zeigte, daß diese Substanz, die von den zu bestimmenden Substanzen die labilste ist, durch das Einengen bei 40°C nicht zerstört wird.

3. Bestimmungsmethoden

3.1 Bestimmung der alkoholischen Gärung

Die Messung der alkoholischen Gärung erfolgte manometrisch als Druckzunahme durch CO_2-Entwicklung.

3.2 Messung der Ansäuerung

Scenedesmus scheidet unter anaeroben Bedingungen als Gärungsendprodukte Säuren aus, die im Außenmedium eine pH-Verschiebung verursachen. Um gut meßbare pH-Verschiebungen zu bekommen, wurde eine niedrigere Na-Phosphatpuffermolarität als in 2.1 und 2.2 beschrieben, verwendet. Sie betrug 0,01 M. Die pH-Verschiebung ergab sich als Differenz zwischen dem pH-Wert einer Nullprobe und dem pH-Wert einer Gärungsprobe nach Ablauf der Versuchszeit. Die pH-Messung erfolgte nach dem Abzentrifugieren der Algen im Überstand mit einer Mikro-Einstab-Glaselektrode Nr. 1290 der Firma Pusl. Mit der Nullprobe wurde in jedem Versuch mit einer eingestellten Milchsäurelösung eine Titrationskurve erstellt. Anhand dieser Kurve konnte die einer gefundenen pH-Verschiebung entsprechende Milchsäuremenge abgelesen werden. Aus dem Vergleich mit der tatsächlich gefundenen enzymatisch bestimmten Milchsäuremenge ergab sich dann der Prozentanteil der Milchsäure an der pH-Verschiebung.

3.3 Bestimmung von Gärungsprodukten und Gärungszwischenstoffen im optischen Test

Die nachfolgend beschriebenen optischen Testverfahren haben alle eine gemeinsame Grundlage (Warburg 1948). Jedes zu bestimmende Substrat wird direkt oder nach

vorheriger enzymatischer Umwandlung durch ein Enzym hydriert oder dehydriert, das zu der entsprechenden Reaktion entweder NAD(P) oder $NAD(P)H_2$ als Cofaktor zur Wasserstoffübertragung benötigt. Da bei der Milchsäurebestimmung das Gleichgewicht ungünstig liegt, muß das Reaktionsprodukt aus dem Gleichgewicht entfernt werden; Pyruvat wird als Hydrazon abgefangen.

a. Ausführung des optischen Tests

Die Extinktionsmessung erfolgte bei Zimmertemperatur in einem Eppendorf-Photometer bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 366 nm.

In jedem Test wurde eine Nullküvette mitgeführt, die an Stelle von Probelösung eine entsprechende Menge an dest. H_2O enthielt.

Für alle Tests wurden Reaktionskinetiken gemessen, die Endwerte waren in der Regel nach 10 Minuten erreicht, bei der D-Laktatbestimmung wurde der Endwert nach 60 Minuten abgelesen. Um sicher zu gehen, daß zu diesem Zeitpunkt noch Cofaktorüberschuß vorhanden war, wurde bei jedem Test nach der Endwertablesung die Reaktion durch Zugabe einer bestimmten Substratmenge erneut gestartet.

b. Testzusammensetzung

Die Testzusammensetzungen wurden teils nach Bergmeyer (1966), teils nach Boehringer Mannheim modifiziert.

<u>D-Milchsäuretest</u>

Prinzip:

$$\text{D-Laktat} + NAD^+ \xrightleftharpoons{\text{D-LDH}} \text{Pyruvat} + NADH + H^+$$

3,0 ml Glycin-Hydrazinpuffer pH 9 (Glycin 0,5 M, Hydrazinhydroxid 0,4 M); 0,2 ml NAD-Lösung (0,045 M); 0,2 ml Probelösung; Start der Reaktion mit 0,02 ml D-Laktatdehydrogenase (15 mg Protein/ml).

Zuckermonophosphattest

Fructose-6-Phosphat (F-6-P) und Glucose-6-Phosphat (G-6-P) wurden zusammen bestimmt.

Prinzip:

$$\text{F-6-P} \xrightleftharpoons{\text{PGI}} \text{G-6-P}$$

$$\text{G-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightleftharpoons{\text{G-6-PDH}} \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

1,87 ml Glycinpuffer pH 9,4 (0,1 M); 0,1 ml NADP-Lösung (0,014 M); 0,01 ml Phosphoglucoseisomerase (2mg/ml); 1 ml Probelösung; Start der NADP-verbrauchenden Reaktion mit 0,02 ml Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (1 mg/ml).

Fructose-1-6-Diphosphattest

Neben Fructose-1-6-Diphosphat (F-1,6-P) werden in diesem zusammengesetzten Test auch Glycerinaldehydphosphat (GAP) und Dinydroxyacetonphosphat (DAP) bestimmt.

Prinzip:

(1) $\text{F-1,6-P} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{Aldolase}} \text{GAP} + \text{DAP}$

(2) $\text{GAP} \xrightleftharpoons{\text{TIM}} \text{DAP}$

(3) $2\text{DAP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{GDH}} 2\ \text{Glycerin-1-P} + 2\text{NAD}^+$

1,91 ml Triäthanolaminpuffer pH 7,6 (0,15 M); 0,05 ml NADH-Lösung (0,015 M); 1 ml Probelösung; Start von Reaktion (2) und (3) mit 0,02 ml TIM/GDH = Triosephosphatisomerase-Glycerinpnosphatdehydrogenase-Mischung (2mg/ml). Nach Endwertablesung Start von Reaktion (1) mit 0,02 ml Aldolase (10 mg/ml).

Pyruvat - Phosphoenolpyruvattest

Prinzip:

(1) $\text{PEP} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{PK}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$

(2) Pyruvat + NADH + H^+ $\rightleftharpoons^{LDH}$ L-Laktat + NAD^+

1,57 ml Triäthanolaminpuffer pH 7,6 (0,15 M); 0,15 ml $MgSO_4$ (0,5 M)/KCl (2 M)-Lösung; 0,2 ml ADP (0,023 M); 0,05 ml NADH (0,015 M) 1 ml Probelösung; Start von Reaktion (2) mit 0,02 ml L-Laktatdehydrogenase (2mg/ml); nach Endwertablesung Start von Reaktion (1) mit 0,01 ml Pyruvatkinase (2 mg/ml).

c. Testauswertung

Die Berechnung der im Test umgesetzten Menge an Substrat ergibt sich nach folgender Gleichung

$$\mu\text{Mol Substrat/ml Probelösung} = \frac{\Delta E \times V_{Küvette}}{\varepsilon \times d \times V_{Einsatz}}$$

d = Schichtdicke (1 cm)

ε = Molarer Extinktionskoeffizient von NADH

$366\ nm = 3{,}3\ cm^2/\mu Mol$

$V_{Küvette}$ = Flüssigkeitsvolumen in der Küvette in ml

$V_{Einsatz}$ = Volumen der eingesetzten Probelösung in ml

3.4 Säulenchromatographische Bestimmung von ^{14}C-Säuren

a. Bildung und Konzentrierung der ^{14}C-Säuren

Zur Bestimmung aller sauren Gärungsprodukte von Scenedesmus wurde den Zellen (220 µg Chlorophyll/ml) Glucose-u-^{14}C zur Vergärung angeboten (Glucoseanfangskonzentration 2,2 mM; µCi siehe jeweiliger Versuch). Nach einer bestimmten Garzeit wurden die Algen abzentrifugiert und je 8,5 ml an Überstand einer Ätherextraktion von 15 Stunden unterzogen. Um die Säuren vor der Ätherverdampfung quantitativ in die wässrige Phase überzuführen, wurden 0,2 ml einer schwachen Lauge zum Äther (ca 60 ml) gegeben und kräftig ausgeschüttelt. Nachdem der Äther verflüchtigt war, blieb ein kleines Wasservolumen (ca 0,6 ml) zurück, in dem die ^{14}C-Säuren vornehmlich als Salze vorlagen. 0,2 ml dieser Lösung wurde deshalb zusam-

men mit einem Überschuß an kalten, als Gärungsprodukte in Frage kommenden Säuren (Ameisen-, Essigsäure usw.) auf eine Säule aufgetragen. Ein Blindversuch mit radioaktiver Essig- und Ameisensäure erbrachte, daß etwa 10% an Radioaktivität durch die Ätherextraktion verloren gehen.

b. Trennung der Säuren über Kieselgelsäulen (Varner 1957)
Zur Bereitung der Kieselgelsäule wurden 18 g wasserfreies Kieselgel mit 10,8 ml 0,0025%iger wässriger Methylorangelösung (Ramsay und Patterson 1948) versetzt, intensiv verrieben, in 50 - 60 ml wassergesättigtem Chloroform aufgeschlämmt und diese Suspension in eine Säule (32 x 1,6 cm) eingefüllt (Simon Floss 1967).

Zum Auftragen der Säuren wurden diese zunächst in 0,3 g wasserfreiem Kieselgel resorbiert und mit diesem die fertige Säule überschichtet. Die Säuren wurden mit einem Chloroform-Butanol-Stufengradienten eluiert. Sie wanderten auf Grund des Indikators als intensiv rote Banden. Die Gradienten bestanden aus wassergesättigtem Chloroform und einer von 0 in 5 Prozentschritten steigenden Konzentration an Butanol. In einem Fraktionskollektor LKB wurden pro Gradient 15 Fraktionen aufgefangen. Bei einer Tropfenzahl von 150 pro Fraktion erhöhte sich das Volumen der Fraktionen beim Übergang von 0% zu 30% Butanol von 2,2 auf ca 2,6 ml. Die Tropfgeschwindigkeit betrug dabei 80 ml pro Stunde. Die aufgetragenen kalten Säuren wandern in der Reihenfolge Essigsäure, Ameisensäure, Milchsäure, als letztes kommt Glykolsäure, die erst bei 30% Butanol quantitativ eluiert wird.

Zur Lokalisierung der "radioaktiven Peaks" wurde zunächst jede dritte Fraktion gezählt (0,2 ml in Dioxan in einem Scintillationszähler Beckmann LS 100), hernach jede Fraktion aus den jeweiligen Peakbereichen. Die Lage der "kalten Peaks" wurde durch Titra-

tion ermittelt. Dazu wurde zu jeder Fraktion ein Tropfen Kongorot gegeben und mit 0,1 n NaOH bis zum Umschlagpunkt mit einer Mikrotitrierpipette titriert. Je nach Lage der kalten und heißen Peaks konnte dann auf das Vorkommen oder Nichtvorkommen einer Säure als Gärungsprodukt bei Scenedesmus geschlossen werden.

Zum quantitativen Vergleich der gebildeten ^{14}C-Säuren untereinander wurden alle Fraktionen der einzelnen "radioaktiven Peaks" vereinigt und ein Aliquot gezählt.

Nach einem Blindversuch mit radioaktiver Ameisen- und Essigsäure gehen weniger als 20% an Radioaktivität beim Säulenlauf verloren.

3.5 Bestimmung der anaeroben Aufnahme von Zuckern

a. D-Glucose
Die Glucoseaufnahme wurde wie in Teil I, Material und Methoden, beschrieben, bestimmt.

b. 3-O-Methylglucose-^{14}C (3-MG-^{14}C)
Algen 260 µg Chlorophyll/ml wurden dazu in 0,03 M Na-Phosphatpuffer mit 1 mM 3-O-Methylglucose (0,015 µCi/ml) in Küvetten anaerob inkubiert. Die entnommenen Proben wurden auf Membranfilter der Firma Sartorius (Porendurchmesser 0,8 mµ) abgenutscht und zweimal mit je 2 ml kaltem Puffer gewaschen. Die abfiltrierten Algen wurden dann mit 1 ml 0,1 n HCl 10 Minuten bei 100°C extrahiert (Komor und Tanner 1971). Nach dem Abzentrifugieren der extrahierten Proben wurden je 0,5 ml Überstand in Dioxan gezählt.

c. 2-Desoxyglucose-^{14}C (2-DG-^{14}C)
Die anaerobe Aufnahme dieses Zuckers erfolgte einschließlich der Extraktion in derselben Weise wie die Aufnahme von 3-MG-^{14}C. Da bei der Aufnahme von

2-DG-^{14}C ein Teil des Zuckers phosphoryliert wird, wurde nach der Extraktion eine bestimmte Menge Überstand (50 µl) auf Whatman 1 - Chromatographiepapier absteigend mit Butanol/Pyridin/Eisessig/H_2O (60 : 40 : 30 : 3) chromatographiert (Laufzeit 15 h). In einem Streifenzähler Typ LB 280 der Firma Frieseke wurde dann die Lage der einzelnen radioaktiven Flecke ermittelt und diese dann mit einem Methandurchflußzählrohr der Firma Frieseke und Höpfner ausgezählt.

3.6 Chemikalien

Alle in den optischen Tests eingesetzten Substrate, Cofaktoren und Enzyme wurden mit Ausnahme der D-Laktatdehydrogenase von der Firma Boehringer Mannheim bezogen. Die D-Laktatdehydrogenase ($(NH_4)_2$ SO_4-Fällung) aus Leuconostoc mesenteroides ATCC 12 291 wurde freundlicherweise von Herrn Karl Stetter zur Verfügung gestellt.

Glucose-U-^{14}C (250 mCi/mMol) wurde von der Firma Boehringer Mannheim bezogen, 3-O-Methylglucose-^{14}C (16 mCi/mMol) vom Radiochemical Centre/Amershan, England und 2-Desoxyglucose-^{14}C (1,67 mCi/mMol) von der New England Nuclear Corporation.

C. ERGEBNISSE und DISKUSSION

1. Hemmung der Gärung von Scenedesmus obliquus D_3 und der Mutante 11 durch Licht

1.1 Wirkung von Licht auf die D-Laktatbildung

Genevois (1927) untersuchte als erster die Gärung von Algen. Er fand, daß verschiedene Arten Säuren ausscheiden und daneben geringfügig CO_2 entwickeln. Gaffron (1939) und Michels (1940) zeigten, daß Chlorella pyrenoidosa und Scenedesmus obliquus unter anaeroben Bedingungen Glucose zu Milchsäure umwandeln. Nach Warburg (1957) handelt es sich bei Chlorella dabei ausschließlich um D-Milchsäure. Umfassende Untersuchungen von Syrett und Wong (1963) an Chlorella vulgaris bestätigen diese frühen Befunde, wonach bei der anaeroben Glucose-Vergärung neben Ameisen- und Essigsäure Milchsäure gebildet wird. Wenn Licht die Gärung von Scenedesmus beeinflußt, dann sollte sich dies in einer Veränderung der Ausscheidung von Milchsäure bemerkbar machen.

Tab.1: Wirkung von Licht auf die D-Laktatbildung von Scenedesmus Wildtyp

	D-Laktatmenge	Hemmung
	µMol/mg Chl./h	%
Dunkel/N_2	1,02	0
Licht /N_2	0,08	92
Dunkel/Luft	0,04	96

Lichtintensität 7000 Lux Weißlicht, alle Werte sind Mittelwerte aus zwei Parallelproben

Die Werte der Tabelle 1 zeigen, daß auch Scenedesmus obliquus bei der Vergärung exogen zugegebener Glucose im Dunkeln, D-Milchsäure ausscheidet. Ein entsprechen-

der optischer Test mit L-Laktatdehydrogenase ergab keinerlei Extinktionszunahme. Die D-Laktatbildung wird nach Tabelle 1 sowohl durch aerobe Bedingungen als auch unter anaeroben Bedingungen durch Licht nahezu vollkommen blockiert. Diese Lichthemmung könnte nun einerseits durch eine gehemmte Glucoseaufnahmerate im Licht oder eine reduzierte Gärungsrate verursacht sein. Da jedoch bekannt ist, daß Licht die Glucoseaufnahme und Assimilation unter anaeroben Bedingungen stimuliert (Tanner et al. 1967), spricht dieses Ergebnis für eine tatsächliche Blockierung der Glykolyse durch Licht. Da aerobe Bedingungen ebenfalls zu einer Hemmung der D-Laktatbildung führen, könnte die Hemmung in N_2 unter Umständen auch durch beim Wildtyp im Licht endogen entwickelten Sauerstoff verursacht werden. Nach den Ergebnissen von Teil I dieser Arbeit muß eine endogene O_2-Entwicklung beim Wildtyp in Betracht gezogen werden. Wenn tatsächlich beim Wildtyp im Licht O_2 die Hemmung verursacht, dann sollte die anaerobe D-Laktatbildung der Scenedesmusmutante 11 durch Licht nicht blockiert werden, da sie nach Bishop (1962) nur noch Lichtreaktion I besitzt, also keinen Sauerstoff mehr entwickeln kann.

Tab.2: Wirkung von Licht auf die D-Laktatbildung von Scenedesmus 11

	D-Laktatmenge	Hemmung
	µMol/mg Chl./h	%
Dunkel/N_2	0,990	0
Licht /N_2	0,192	80,5
Licht /Luft	0,000	100
Dunkel/Luft	0,006	99,5

Lichtintensität 7000 Lux Weißlicht, alle Werte sind Mittelwerte aus zwei Parallelproben.

Nach Tabelle 2 wird auch die anaerobe D-Laktatbildung der Scenedesmusmutante 11 im Licht stark gehemmt. Die Vermutung liegt deshalb nahe, daß es sich bei dieser Lichthemmung sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante 11 um einen Pasteur-ähnlichen Effekt handelt, der nicht durch die Atmungsketten-, sondern durch Lichtphosphorylierung verursacht wird. Nach Teil I dieser Arbeit wird unter anaeroben Bedingungen im Licht die Glucoseaufnahme und damit auch die ATP-Konzentration im Zytoplasma wahrscheinlich durch den ATP-Transport durch die Chloroplastenmembran limitiert. Beruht die Hemmung der D-Laktatbildung im Licht auf einer ATP-Bildung durch zyklische Photophosphorylierung, so sollte diese Hemmung mindestens so früh lichtgesättigt sein wie die anaerobe Photoassimilation von Glucose.

Tatsächlich sind nach Abb.1 bei der Mutante 11 die anaerobe Glucoseassimilation und die Hemmung der D-Laktatbildung gleich früh bei ca 2000 Lux gesättigt. Die in diesem Experiment mitverfolgte CO_2-Entwicklung auf Grund alkoholischer Gärung wird ebenfalls im Licht stark blockiert, diese Hemmung ist nur geringfügig später bei etwa 3000 Lux gesättigt.

In allen Gärungsexperimenten mit der Mutante 11 war die maximale Hemmung der D-Laktatbildung unter N_2 im Licht immer etwa um 20% niedriger als beim Wildtyp bei denselben Bedingungen. Unter Luft wird jedoch sowohl im Dunkeln als auch im Licht wie beim Wildtyp unter N_2 dieselbe hohe Hemmung von nahezu 100% erreicht (Tab.2). Die zyklische Photophosphorylierung der Mutante 11 scheint deshalb nicht ganz auszureichen, um eine völlige Blokkierung der D-Laktatbildung im Licht zu verursachen. Die stärkere Blockierung beim Wildtyp könnte dann auf einer wirkungsvolleren zyklischen Photophosphorylierung oder auf einer zusätzlichen, durch endogen entwickelten Sauerstoff hervorgerufenen Atmungskettenphosphorylierung beruhen. (Siehe dazu Teil I, Schlußbetrachtung)

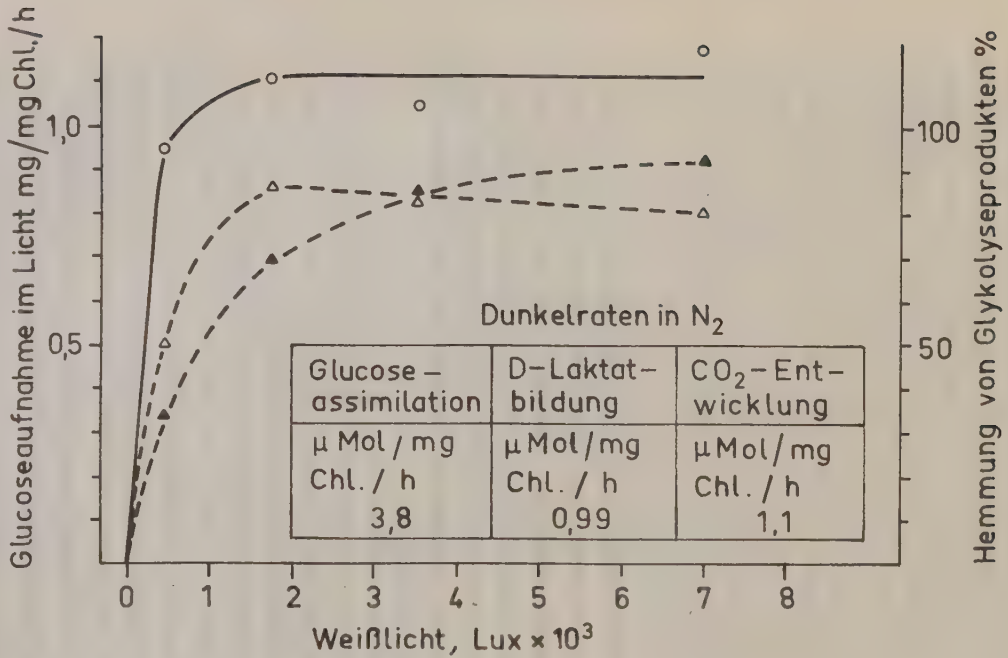

Abb.1: Glucoseaufnahme und Gärungshemmung von Scenedesmus 11 in Abhängigkeit von der Lichtintensität

○ Glucoseaufnahme im Licht; △ Hemmung der D-Laktatbildung; ▲ Hemmung der CO_2-Entwicklung;

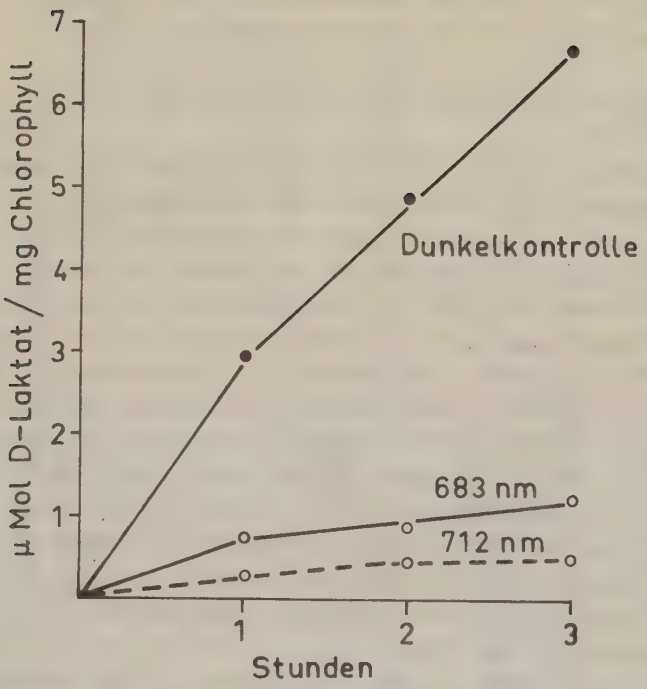

Abb.2: Wirkung von Dunkelrotlicht auf die D-Laktatbildung von Scenedesmus Wildtyp

Algendichte 300 µg Chl./ml, Lichtintensität (683 nm und 712 nm) 8300 erg/cm^2·sec

Für die primäre Beteiligung der zyklischen Photophosphorylierung an der Blockierung der D-Laktatbildung des Scenedesmus Wildtyp spricht die Tatsache, daß diese Hemmung auch durch Licht >700 nm hervorgerufen wird.

Nach Abb.2 wird auch durch Licht der Wellenlänge 712 nm, das spezifisch Lichtreaktion I anregt und bei dieser Intensität für die photosynthetische CO_2-Entwicklung we-

sentlich unwirksamer ist (Tanner et al. 1966), eine praktisch vollständige Hemmung der anaeroben D-Laktatbildung erreicht. Diese ist dabei mit 92% größer als die Hemmung durch Licht der Wellenlänge 683 nm, die um 10% niedriger liegt. Licht >700 nm ist demnach für die Hemmung der anaeroben D-Laktatbildung am wirksamsten.

1.2 Wirkung von Licht auf die pH-Verschiebung

Nach Begum und Syrett (1970) haben einzellige Algen teilweise recht unterschiedliche Gärungsmuster. So wandelt z.B. die farblose Alge Prototheca zopfii Glucose vollkommen in Milchsäure um, bei Chlorella 211/1e tritt neben einer geringen CO_2-Entwicklung Milchsäure als einziges saures Gärungsprodukt auf. Allein in der Gattung Chlorella ergaben sich wesentliche Unterschiede in der Gärung, es fanden sich Stämme, die Glucose zu einem Drittel, andere zu zwei Drittel in Milchsäure umwandeln, daneben Stämme, die zwar Säuren ausscheiden, aber keine Milchsäure bilden, und wieder andere, die gar keine Glucose vergären können. Nach der in Abb.1 eingesetzten Tabelle werden bei der Mutante 11 im Dunkeln pro 3,8 µMol aufgenommener Glucose 0,99 µMol D-Milchsäure und 1,1 µMol CO_2 gebildet, was einem Abbau von etwa 1 µMol Glucose entspricht. Durch diesen Abbau können 2 µMol ATP gewonnen werden, wodurch maximal ein weiteres µMol Glucose assimiliert werden kann. Es bleibt dann aber noch eine Restaufnahme von 1,8 µMol Glucose, die durch die D-Laktatbildung und CO_2-Entwicklung und den damit verbundenen Energiegewinn nicht verursacht worden sein kann. Es liegt deshalb nahe, daß bei Scenedesmus noch weitere Gärungsprodukte ausgeschieden werden. Handelt es sich dabei um saure Produkte, so sollte sich dies durch einen Vergleich der durch die sauren Produkte entstehenden pH-Verschiebung im Außenmedium mit der D-Milchsäurebildung zeigen lassen. Wenn bei Scenedesmus tatsächlich andere saure Produkte auftreten, so war es wichtig zu sehen, ob auch deren Bildung durch Licht gehemmt wird.

Tab.3: Wirkung von Licht auf die Gesamtsäurenproduktion von Scenedesmus 11

1	2	3		4		5
	pH-Verschiebung	Zur pH-Verschiebung nötige D-Laktatmenge		Tatsächlich gefundene D-Laktatmenge		%-Anteil der D-Laktatbildung an der Gesamtsäurenproduktion
	pH	$\frac{\mu Mol}{2,5\ ml}$	% Hemmung	$\frac{\mu Mol}{2,5\ ml}$	% Hemmung	%
Dunkel/N_2	6,62 - 5,35	5,9	0	1,75	0	30,0
Licht /N_2	6,62 - 6,45	1,4	76	0,3	83	21,5
Dunkel/Luft	6,62 - 6,61	0,0	100	0,0	100	0,0

Inkubationszeit 4 h, Lichtintensität 1750 Lux Weißlicht

In Tabelle 3 ist dazu ein Versuch mit der Mutante 11 aufgezeichnet. Auch hier wird wieder die anaerobe D-Laktatbildung durch Licht und aerobe Bedingungen stark gehemmt (Spalte 4). Daneben findet sich außerdem eine starke Hemmung der unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln auftretenden Ansäuerung durch Licht (Spalte 2). In Spalte 3 sind die nach einer Titrationskurve bestimmten D-Laktatmengen wiedergegeben, die nötig gewesen wären, um die entsprechenden pH-Verschiebungen zu verursachen, wenn nur Milchsäure gebildet worden wäre. Die tatsächlich gefundenen Mengen an D-Milchsäure sind sowohl im Dunkeln als auch im Licht nur etwa 20 - 30% dieser Werte, aus denen sich auch das genaue Ausmaß der Hemmung der Gesamtsäurenproduktion ergibt (% Werte der Spalte 3). Aus diesen Daten geht zum einen hervor, daß bei Scenedesmus neben D-Milchsäure noch weitere saure Gärungsprodukte entstehen, zum anderen, daß die Bildung dieser Produkte unter anaeroben Bedingungen durch Licht in gleicher Weise wie die D-Milchsäureausscheidung gehemmt wird. Die anaerobe Milchsäurebildung kann demnach, da sie sowohl im Licht als auch im Dunkeln in allen Experimenten dieser Art, etwa 30% der Gesamtsäurenproduktion ausmachte, als guter Indikator für die Gärung von Scenedesmus verwendet werden.

1.3 Hemmung der D-Laktatbildung im Licht-Dunkelwechsel

Beruht die Hemmung der D-Laktatbildung tatsächlich auf der Bildung von ATP aus der zyklischen Photophosphorylierung, so sollte sie beim Lichtausschalten rasch wieder verschwinden.

In Abb.3 ist dazu ein entsprechendes, in Küvetten ausgeführtes Experiment mit der Mutante 11 dargestellt. Die Dunkelgärungsrate (µMol D-Laktat/mg Chl./h) war zunächst in beiden "Lichtküvetten" in gleicher Weise stark gehemmt, nach 90 Minuten wurde bei einer der

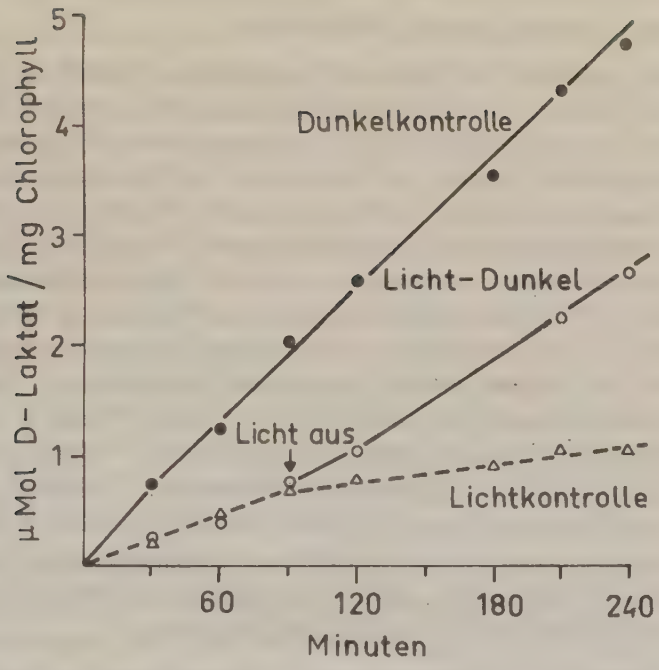

Abb.3: Hemmung der D-Laktatbildung im Licht-Dunkelwechsel

Algendichte 260 µg Chl./ml, Lichtintensität 34 000 erg/cm^2·sec (Weißlicht)

Lichtküvetten das Licht ausgeschaltet (Licht-Dunkel), und tatsächlich wurde in dieser Küvette nach kurzer Zeit nahezu dieselbe Rate wie in der Dunkelkontrolle erreicht.

1.4 Wirkung von Licht auf Glykolysezwischenstoffe

Die bisher beschriebenen Ergebnisse stützen die Vermutung, daß die Lichthemmung der D-Laktatbildung

durch zyklische Photophosphorylierung verursacht wird, sie geben jedoch noch keinen Aufschluß, in welcher Weise und an welcher Stelle die Lichtphosphorylierung die Glykolyse beeinflussen kann.

Nach Kandler und Haberer-Liesenkötter (1963) weist der Anstieg der Phosphoglycerinsäurekonzentration beim Licht-Dunkelwechsel in Chlorella auf eine Hemmung der Glykolyse im Licht hin. Als Erklärung für diese Hemmung wird der von Kandler (1950) beobachtete Phosphatabfall in Chlorellazellen durch Lichtphosphorylierung herangezogen, der zu einer Blockierung der PO_4^{3-}-abhängigen Triosephosphatoxidation führen soll. Diese Erklärung, die mit der von Lynen (1957) für den Pasteureffekt gefundenen konform geht, wurde durch Versuche von Santarius und Heber (1965) mit Blättern in Frage gestellt. Danach soll Licht, auf Grund des außerordentlich langsamen PO_4^{3-}-Austausches zwischen dem Zytoplasma und den Chloroplasten (Heber et al. 1964), nicht durch Veränderungen des Phosphatspiegels, sondern des ATP/ADP-Verhältnisses regulierend auf die Glykolyse einwirken.

Neuere Untersuchungen über den Pasteureffekt haben gezeigt, daß in den unterschiedlichsten Organismen ein wesentlicher Regulationspunkt der Glykolyse der Schritt vom Fructose-6-Phosphat zum Fructose-1,6-Diphosphat ist. So wird z.B. die Glykolyse in Muskeln (Uyeda und Racker 1965) und Hefen (Ramaiah et al. 1964) durch die Phosphofructokinase kontrolliert. Lowry und Passoneau (1964) verglichen die Phosphofructokinase aus tierischen und pflanzlichen Zellen und aus Bakterien. In allen Fällen wurde dieses Enzym durch hohe ATP-Konzentrationen gehemmt. Charakteristisch für die pflanzliche Phosphofructokinase ist dabei, daß diese Hemmung durch ATP im Gegensatz zu tierischen Geweben und Hefen nicht durch ADP und AMP verringert werden kann. Versuche mit Karotten-

phosphofructokinase (Dennis und Coultate 1966) sprechen dafür, daß bei Pflanzen möglicherweise anorganisches Phosphat und Fructose-6-Phosphat diese Rolle übernehmen.

Wenn auch in der Glykolyse von Scenedesmus die Phosphofructokinase ein entscheidender Regulationspunkt ist, so müßte man annehmen, daß eine durch ATP aus der zyklischen Photophosphorylierung hervorgerufene Hemmung auch an dieser Stelle eingreift. Zur Prüfung dieser Vermutung erwies sich die Bestimmung von Veränderungen in den Glykolysezwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel-Lichtwechsel als besonders geeignet. Die Blockierung einer Reaktionskette an einer bestimmten Stelle zeigt sich gewöhnlich in einem Anstieg der Konzentration des vor dieser Stelle liegenden Substrates, während die Konzentration des nachfolgenden Zwischenstoffes abfällt. Bei einer Blockierung der Phosphofructokinase sollte sich demnach eine Zunahme in den Zuckermonophosphaten und eine Abnahme im Fructosediphosphat ergeben.

Abb.4 zeigt die Veränderungen in den Zuckermonophosphaten und im Fructosediphosphat bei der Mutante 11 und beim Wildtyp nach dem Lichteinschalten. Die Zellen wurden dazu 45 Minuten mit Glucose anaerob im Dunkeln inkubiert. Die Nullminutenwerte geben die im optischen Test bestimmten Zwischenstoffkonzentrationen im stationären Fließgleichgewicht im Dunkeln an. Für Fructosediphosphat ergab sich bei Scenedesmus 11 und Wildtyp ein etwa 3,5mal größerer Wert als für Chlorella unter ähnlichen Bedingungen (Kandler und Haberer-Liesenkötter 1963), was möglicherweise auf die Verwendung von frisch geernteten Scenedesmuszellen zurückzuführen ist. Sowohl bei der Mutante 11 als auch beim Wildtyp findet sich innerhalb von 2-5 Minuten im Licht ein beachtlicher Anstieg in den Zuckermonophosphaten und ein leichter Abfall im Fructosediphosphat. Bei der Mutante 11 erhöht sich die Zuckermonophosphatkonzentration innerhalb von zwei Minuten um etwa 50% des Ausgangswertes, beim Wildtyp wurde ein längerer Zeitraum verfolgt, wobei sich ein Anstieg um ca

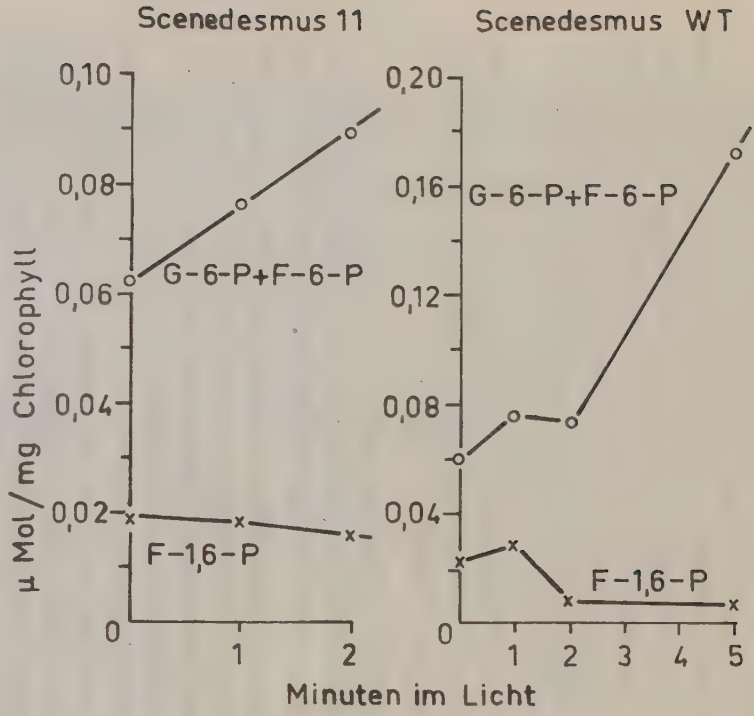

Abb.4: Veränderungen der Zuckermonophosphat- und Fructosediphosphatkonzentrationen im Dunkel/Lichtwechsel bei Scenedesmus 11 und Scenedesmus Wildtyp

150% ergab. Der gleichzeitige leichte Abfall im Fructosediphosphat, der beim Wildtyp stärker ist, spricht für eine tatsächliche Hemmung der Phosphofructokinase.

Nach Mossberg und Mayer (1964) wird auch die Pyruvatkinase durch ATP gehemmt. Nach Kobr und Beevers (1970) ist neben der Phosphofructokinase die Pyruvatkinase ein zweiter wesentlicher Regulationspunkt in der Glykolyse von Rhizinusendosperm. Versuche, die in ähnlicher Weise wie für die Phosphofructokinase eine Beeinflussung der Pyruvatkinase von Scenedesmus durch Lichtphosphorylierung zeigen sollten, blieben ohne greifbares Ergebnis. Pyruvat war sowohl beim Scenedesmus Wildtyp als auch bei der Mutante 11 enzymatisch praktisch nicht nachweisbar, geringe Mengen an Phosphoenolpyruvat wurden zwar gefunden, es ergaben sich jedoch keine Veränderungen im Dunkel-Lichtwechsel.

1.5 Wirkung von CCP (=Carbonylcyanid p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) auf die Hemmung der D-Laktatbildung durch Licht

Eine durch ATP aus der zyklischen Photophosphorylierung hervorgerufene Hemmung der Gärung sollte sich durch eine Blockierung dieser Phosphorylierung aufheben lassen. Die von Heytler und Prichard (1962) als Entkoppler eingeführten Derivate des Carbonylcyanidphenylhydrazons erwiesen sich als wirkungsvolle Hemmstoffe der Lichtphosphorylierung. Nach Avron und Shavit (1965) wird sowohl die nichtzyklische als auch die zyklische Photophosphorylierung in Chloroplasten durch CCP gehemmt. Tanner et al. (1969) fanden eine spezifische Hemmung der zyklischen Photophosphorylierung, gemessen an der anaeroben Photoassimilation von Glucose durch CCP bei Chlorella und Scenedesmus 11. Danach hat CCP ($3x10^{-5}$ M) bei Chlorella, das die anaerobe Photoassimilation von Glucose zu 90% blockiert, nur geringen Einfluß auf die photosynthetische O_2-Entwicklung. Ähnlich wurde bereits 1963 von

Wiessner eine Hemmung der Photosystem I-abhängigen Assimilation von Acetat durch CCP bei Chlamydobotris beschrieben.

CCP schien deshalb geeignet, eine durch zyklische Photophosphorylierung hervorgerufene Gärungshemmung aufzuheben. In einem Vorversuch zeigte sich allerdings, daß CCP bereits die Dunkelvergärung exogen gebotener Glucose beeinflußt.

Tab.4: Wirkung von CCP auf die anaerobe D-Laktatbildung und Glucoseaufnahme von Scenedesmus 11 im Dunkeln

	D-Laktatmenge		Glucoseaufnahme	
	$\frac{\mu Mol}{mgChl.xh}$	% Hemmung	$\frac{\mu Mol}{mgChl.xh}$	% Hemmung
Kontrolle	1,50	0	5,80	0
CCP-$2x10^{-5}$M	0,35	76,5	0,31	94,5

Nach Tabelle 4 wird die Dunkelglucoseaufnahme von Scenedesmus 11 durch $2x10^{-5}$M CCP nahezu vollkommen gehemmt, die D-Laktatbildung etwas weniger. Da dieses Ergebnis möglicherweise eine Blockierung des Glucoseaufnahmesystems wiederspiegelt, wurde die Wirkung von CCP auf die endogene Gärung untersucht.

Nach Tabelle 5 wird auch die endogene D-Laktatbildung des Scenedesmus Wildtyp, die nur etwa 3% der exogenen ausmacht (Tab.1), sowohl durch Licht als auch durch aerobe Bedingungen stark gehemmt. Der genaue Prozentsatz der Hemmung kann jedoch nicht angegeben werden, da die Werte für Licht/N_2 und Dunkel/Luft bereits in der Fehlergrenze liegen. Überraschend war an diesem Versuch, daß die D-Laktatbildung nicht nur im Licht, sondern auch im Dunkeln durch $2x10^{-5}$M CCP stark gefördert wird. Es kann deshalb leider nicht entschieden werden, ob die im Licht gefundene Steigerung der D-Laktatausscheidung

Tab.5: Wirkung von CCP auf die Hemmung der endogenen Gärung von Scenedesmus Wildtyp durch Licht

	D-Laktatmenge	% der Kontrolle (Dunkel/N_2)
	µMol/mg Chl./h	%
Dunkel/N_2	0,030	100
Dunkel/N_2 + CCP	0,177	590
Licht /N_2	0,007	---
Licht /N_2 + CCP	0,109	360
Dunkel/Luft	0,004	---
Dunkel/Luft+CCP	0,004	---

durch eine entkoppelte Lichtphosphorylierung oder nur durch eine reine Beschleunigung der Dunkelgärungsrate hervorgerufen wird. Die Tatsache, daß unter aeroben Bedingungen bei Anwesenheit von $2x10^{-5}$M CCP keinerlei D-Laktatbildung auftritt, könnte auf einer nicht ausreichenden Entkopplung der Atmungskettenphosphorylierung beruhen. So wird nach Tanner et al. (1969) die aerobe Glucoseassimilation von Chlorella durch $3x10^{-5}$M CCP nur zu 55% gehemmt.

Die in Tabelle 4 beschriebene Dunkelglucoseaufnahmehemmung durch CCP muß nach den Ergebnissen der Tabelle 5 durch eine "entkoppelte", ohne Energiegewinn ablaufende Gärung verursacht worden sein. Der dadurch hervorgerufene Substratmangel führt natürlich auch zu einer Hemmung der D-Laktatbildung, bezogen auf die Kontrolle. Die noch vorhandene D-Laktatausscheidung zeigt wahrscheinlich in erster Linie eine "entkoppelte" endogene Gärung.

Diese Versuche brachten zwar keinen weiteren Beweis für einen, durch zyklische Photophosphorylierung hervorgerufenen Pasteur-ähnlichen Effekt, jedoch die wichtige

Erkenntnis, daß CCP offensichtlich nicht nur als Entkoppler von Elektronentransportketten fungiert, sondern auch Substratkettenphosphorylierungen blockieren kann. Da gleichzeitig eine gesteigerte D-Laktatbildung zu beobachten ist, kann man tatsächlich von einer "Entkopplung" der Gärung sprechen. Eine Hemmung von Energie-abhängigen Prozessen unter anaeroben Bedingungen wurde für die Entkopplergifte, 2,4-Dinitrophenol und Azid, mehrfach beschrieben, bei Bakterien (Fowler 1951, Kovac und Kuzela 1966), bei Hefen (Kovac und Istenesova 1964, Jarett und Hendler 1967) und bei Tieren (Emmelot und Bos 1959, Jarett und Kipnis 1967). CCP hemmt nach Galeotti et al. (1968) die Atmungsadaptation von anaerob gewachsenen Hefen, die von der Gärung abhängig ist. Sie finden jedoch keine Beeinträchtigung der anaeroben Glucosevergärung durch CCP und schreiben den Hemmeffekt auf die Atmungsadaptation einer allgemeinen Beeinträchtigung von Membranfunktionen zu, wie sie von mehreren Forschern für Entkoppler bschrieben wird (Mitchell und Moyle 1967, Bielawski et al. 1966, van Dam und Slater 1967). Die anaerobe Dunkelglucoseaufnahme von Scenedesmus durch CCP wird jedoch stark gehemmt. Diese Hemmung könnte deshalb besser mit einer durch CCP hervorgerufenen gesteigerten ATPase-Aktivität erklärt werden, die auch eine Förderung der D-Laktatausscheidung auf Grund einer Senkung des ATP-Spiegels und einer dadurch hervorgerufenen Steigerung der Phosphofructokinase zur Folge haben müßte. So wurde z.B. von Dawkins et al. (1960) eine Steigerung der ATP-Spaltung durch DNP beschrieben.

2. Förderung der Gärung von Scenedesmus 8 durch Licht

2.1 Wirkung von Licht auf die D-Laktatbildung

Nachdem sich mit CCP eine durch ATP aus der zyklischen Photophosphorylierung hervorgerufene Hemmung der Gärung von Scenedesmus Wildtyp und Scenedesmus 11 nicht beweisen ließ, war es interessant, ob dies mit Hilfe einer

zur Photophosphorylierung unfähigen Mutante möglich ist. Es wurden deshalb Versuche mit der Scenedesmusmutante 8 durchgeführt, die nach Bishop (1963) nur noch Lichtreaktion II besitzt und deshalb zu einer Lichtphosphorylierung nicht mehr in der Lage sein sollte.

Tab.6: Wirkung von Licht auf die D-Laktatbildung von Scenedesmus 8

	D-Laktatmenge		Glucoseaufnahme
	$\frac{\mu Mol}{mgChl.xh}$	% der Kontrolle	$\frac{\mu Mol}{mgChl.xh}$
Dunkel/N_2	1,8	100	5,6
Licht /N_2	4,6	257	8,41
Dunkel/Luft	0,0	0	17,5

Lichtintensität 7000 Lux Weißlicht, alle Werte sind Mittelwerte aus zwei Parallelproben

Nach Tabelle 6 wird die anaerobe D-Laktatbildung dieser Mutante im Dunkeln durch Sauerstoff vollkommen blockiert. Im Licht findet sich jedoch nicht nur keinerlei Hemmung der Dunkelrate, sondern eine starke Stimulierung der D-Laktatbildung.

In Tabelle 6 sind auch die Glucoseaufnahmeraten dieses Versuches wiedergegeben. Danach wird die Glucoseaufnahme durch Licht leicht erhöht, was auch schon von Tanner et al. (1967) und Pratt und Bishop (1968) bei Scenedesmus 8 beobachtet wurde und bislang nicht erklärt werden konnte. Die durch Licht stimulierte Gärungsrate und eine damit verbundene gesteigerte glykolytische ATP-Produktion ist eine gute Erklärungsmöglichkeit für die Lichtabhängige Glucoseassimilation in dieser Mutante. Tabelle 6 zeigt, daß im Licht zusätzlich 2,8 µMol Glucose aufgenommen und 2,8 µMol D-Laktat produziert wurden. Für jedes zusätzlich im Licht abgebaute µMol Glucose wird demnach ein weiteres assimiliert, wogegen im Dunkeln na-

türlich neben D-Milchsäure auch die Bildung anderer saurer Produkte für die Glucoseaufnahme verantwortlich ist.

2.2 Wirkung von Licht auf die pH-Verschiebung

Nach Tabelle 3 wird beim Scenedesmus Wildtyp und bei der Mutante 11 die Gesamtsäurenproduktion durch Licht in gleicher Weise gehemmt wie die D-Laktatbildung. Nimmt man einen ATP-Bedarf von 2 ATP pro Mol assimilierter Glucose an, so deuten die Werte der Tabelle 6 darauf hin, daß bei Scenedesmus 8 durch Licht möglicherweise in erster Linie die Ausscheidung von D-Milchsäure stimuliert wird. Ein Vergleich zwischen pH-Verschiebung und D-Laktatbildung sollte darüber Aufschluß geben.

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse zweier Experimente, in denen die pH-Verschiebung und die D-Laktatbildung simultan verfolgt wurden. Es konnte in beiden Fällen im Licht eine stimulierte Ansäuerung festgestellt werden, die allein durch die geförderte D-Laktatausscheidung verursacht wurde. Im Dunkeln verhält sich die Mutante 8 jedoch genau wie der Wildtyp und die Mutante 11, hier ist die Gesamtsäurenproduktion wesentlich größer als die D-Laktatbildung (Tab.7).

2.3 Bestimmung aller sauren Produkte von Scenedesmus 8 und ihrer Veränderung im Licht

Auf Grund der Ergebnisse der Tabelle 7 müßte man annehmen, daß Licht ziemlich direkt die Bildung von D-Milchsäure fördert. Es gab jedoch auch Versuche, wenn auch nur wenige, in denen die zusätzlich im Licht gebildete Menge an D-Milchsäure allein nicht ganz die ebenfalls stimulierte pH-Verschiebung verursacht haben konnte. Um zu prüfen, ob möglicherweise doch auch die Bildung anderer saurer Gärungsprodukte von Scenedesmus 8 durch Licht gefördert werden kann, sollten alle Gärungsprodukte bestimmt werden. Da bislang noch

Tab.7: Wirkung von Licht auf die Gesamtsäurenproduktion von Scenedesmus 8, gemessen an der pH-Verschiebung

	Versuch 1	Versuch 2
Dunkel/N_2		
pH-Verschiebung	6,7 - 6,11	6,6 - 5,51
Zur pH-Verschiebung nötige Menge an D-Laktat (µMol)	4,8	6,1
Tatsächlich gefundene D-Laktatmenge (µMol/ 2,5 ml)	0,44	1,18
Licht/N_2		
pH-Verschiebung	6,69 - 5,97	6,6 - 4,81
Zur pH-Verschiebung nötige Menge an D-Laktat (µMol)	5,5	7,35
Tatsächlich gefundene D-Laktatmenge (µMol/ 2,5 ml)	1,23	2,54
Licht-Dunkel-Differenz		
Zur pH-Verschiebung nötige Menge an D-Laktat (µMol)	0,7	1,25
Tatsächlich gefundene D-Laktatmenge (µMol/ 2,5 ml)	0,79	1,36

Inkubationszeit 2 h, Lichtintensität 6500 erg/cm^2·sec (Blaulicht 454 nm), Algendichte 220 µg Chl./ml

nicht bekannt war, welche Säuren neben Milchsäure in der Gärung von Scenedesmus zusätzlich gebildet werden, sollten solche Versuche auch das Gärungsmuster von Scenedesmus aufzeigen. In diesem Zusammennang war es auch interessant, ob bei Scenedesmus 8 eine Glykolatbildung stattfindet, da Kowallik (1969 b) für die Blaulicht-stimulierte Ansäuerung bei einer gelben Chlorellamutante eine gesteigerte Glykolsäureausscheidung in Erwägung zieht.

Nach Syrett und Wong (1963) tritt in der Gärung von Chlorella vulgaris neben Milchsäure auch Ameisen- und Essigsäure auf. Da möglicherweise auch von Scenedesmus Essigsäure und Ameisensäure gebildet werden, diese Säuren jedoch flüchtig sind, wurden alle sauren Produkte von Scenedesmus 8 über Kieselgelsäulen getrennt und bestimmt. Dazu wurde den Algenzellen Glucose-u-^{14}C zur Vergärung angeboten und das Medium nach der Inkubation einer Ätherextraktion unterzogen. Der Ätherextrakt wurde dann zusammen mit einem Überschuß an kalten, als Gärungsprodukte in Frage kommenden Säuren versetzt auf die Säule aufgetragen und eluiert (siehe Material und Methoden).

Abb.5 zeigt einen Säulenlauf, in dem die im Licht gebildeten sauren Gärungsprodukte von Scenedesmus 8 eluiert wurden. Die gestrichelte Linie gibt die Lage der durch Titration bestimmten, im Überschuß zugegebenen kalten Säuren wieder, sie zeigt auch die Reihenfolge, in der die einzelnen Säuren eluiert werden (Varner 1957). Jeweils an der Stelle der Essigsäure, Ameisensäure und der Milchsäure finden sich auch "radioaktive Peaks", d.h., daß diese Säuren von Scenedesmus 8 gebildet werden. In den Fraktionen, in denen die Glykolsäure eluiert wurde, findet sich keinerlei Radioaktivität. Es tritt also bei Scenedesmus 8 im Licht sicher keine gesteigerte Glykolsäurebildung auf. Ebenso konnte im Dunkeln keinerlei Glykolsäure nachgewiesen werden. In den vor der Essigsäure eluierten Fraktionen 3-15 fanden sich geringe Mengen an Radioaktivität, wobei titrimetrisch keine Säure nachzuweisen war. Es wurde nicht bestimmt, um welches Gärungsprodukt es sich dabei handelt, nach Simon-Floss (1967) kann möglicherweise Propionsäure oder Buttersäure in Frage kommen.

Neben Milchsäure tritt also auch Essigsäure und Ameisensäure in der Gärung von Scenedesmus 8 auf. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse zweier Versuche dargestellt, in denen die Bildung dieser drei Säuren sowohl im Dunkeln als

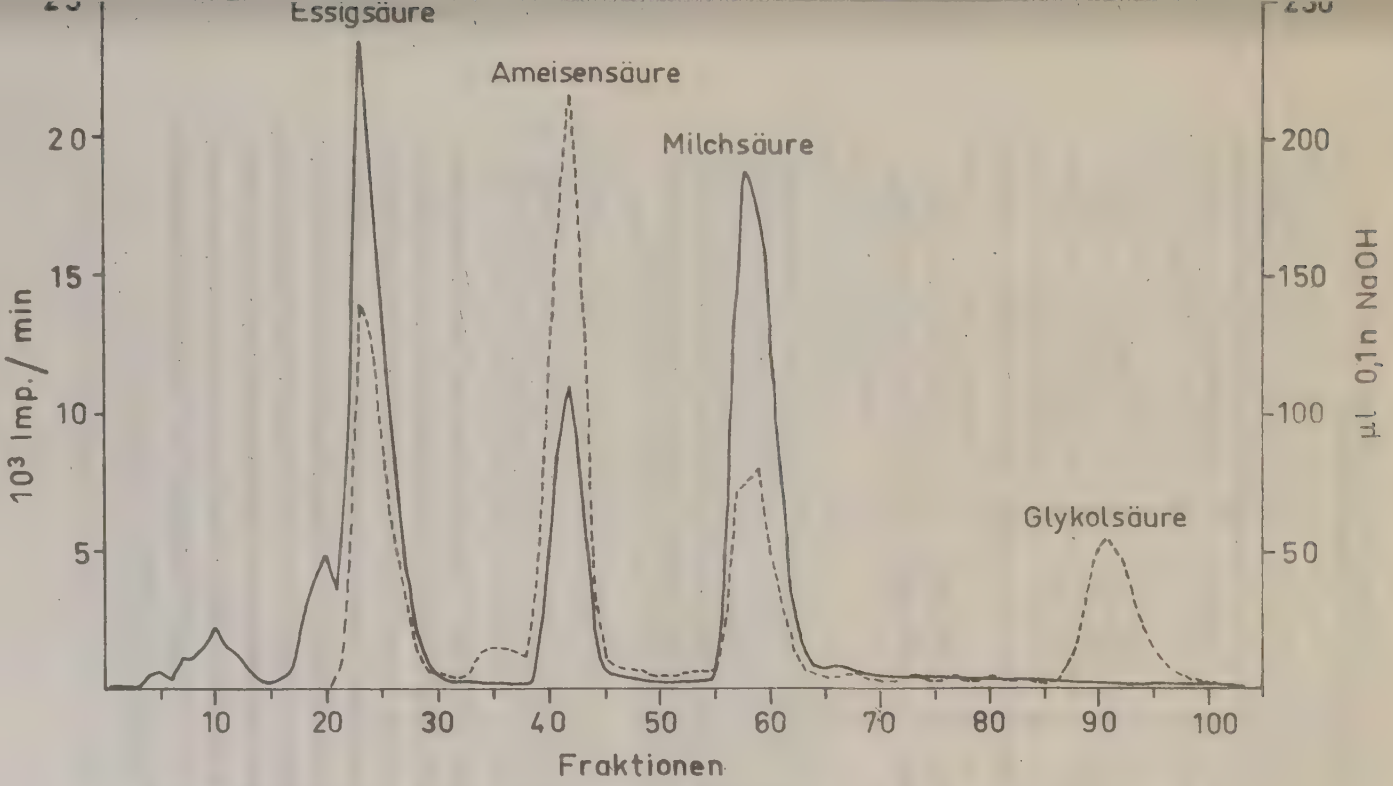

Abb.5: Bestimmung aller sauren Produkte von Scenedesmus 8 im Licht nach Glucose-u-^{14}C-Vergärung durch Kieselgelsäulenchromatographie. Algen 220 µg Chl./ml wurden mit Glucose-u-^{14}C (5µCi/ml) 1h inkubiert. 0,1 ml Ätherextrakt wurden zusammen mit 0,87 mM Essigsäure, 1,06 mM Ameisensäure, 0,83 mM Milchsäure und 0,53 mM Glykolsäure aufgetragen. Lichtintensität 6500 erg/cm^2·sec (Blaulicht 454 nm). --- Durch Titration bestimmte Säuremenge; —— Radioaktivität der einzelnen Fraktionen

Tab.8: Einfluß von Licht auf die Bildung aller sauren Gärungsprodukte von Scenedesmus 8

	Dunkelprobe	Lichtprobe	% der Dunkelwerte
	Imp/min	Imp/min	%
Versuch 1			
Essigsäure	832.660	1.230.000	148
Ameisensäure	369.390	614.000	166
Milchsäure	641.600	1.242.000	194
Versuch 2			
Essigsäure	279.600	289.640	104
Ameisensäure	110.540	110.100	100
Milchsäure	181.960	318.170	175

Inkubationszeit mit Glucose-u-^{14}C in Versuch 1 mit 5µCi/ml, in Versuch 2 mit 1,25 µCi/ml. Die Werte geben die Gesamtradioaktivitäten der in den einzelnen Säulenläufen eluierten Säuren an, die Lichtwerte wurden dazu entsprechend dem Verhältnis der jeweils aus 8,5 ml Medium extrahierten Gesamtradioaktivitäten von Dunkel- und Lichtprobe verändert. Lichtintensität 6500 erg/cm^2·sec (Blaulicht 454 nm)

auch im Licht verfolgt und miteinander verglichen wurde. Die Werte stellen jeweils die Gesamtradioaktivitäten der einzelnen, bei einem Säulenlauf eluierten Säuren dar.

Nach Syrett und Wong (1963) werden bei der Gärung von Chlorella vulgaris Essigsäure, Ameisensäure und Milchsäure in äquimolarer Menge gebildet. Für Scenedesmus 8 ergibt sich nach Versuch 1 der Tabelle 8 im Dunkeln ein etwas anderes Verhältnis, Essigsäure : Ameisensäure : Milchsäure wie 1,9 : 1,7 : 1, wonach fast doppelt soviel Essig- und Ameisensäure wie Milchsäure entstehen. Etwa gleiche Mengen von Essig- und Ameisensäure deuten auch hier wie bei Chlorella vulgaris auf eine Entstehung dieser Säuren durch Spaltung von Pyruvat hin.

In Versuch 1 und 2 konnte nun eine unterschiedliche Förderung der einzelnen Gärungsprodukte durch Licht festgestellt werden. In Versuch 2 findet sich, wie bei den pH-Verschiebungsexperimenten nur eine Förderung in der Milchsäure, in Versuch 1 tritt jedoch eine Förderung in allen drei Säuren auf, wobei Milchsäure den größten Anstieg aufweist. Dieses Ergebnis zeigt, daß Licht offensichtlich nicht nur die D-Milchsäurebildung fördern kann, man hätte in diesem Fall eine spezifische Stimulierung der Laktatdehydrogenase fordern müssen. Die Tatsache, daß Milchsäure trotzdem immer am stärksten gefördert wird, läßt sich möglicherweise mit einer, schon bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen gesättigten Pyruvatspaltung erklären, die unter Umständen vom Zustand der Algen abhängen könnte.

2.4 Abhängigkeit der Gärungsstimulierung von der Lichtqualität und Lichtintensität

Die von Kowallik (1969 b) beschriebene lichtstimulierte Ansäuerung durch endogene Gärung besitzt dasselbe Aktionsspektrum wie die lichtstimulierte, bei derselben Mutante auftretende Atmungssteigerung. Dieses Spektrum besitzt ein Hauptmaximum bei 470 nm und ein kleineres bei 350 nm. Rotlicht zeigte keinerlei fördernde Wirkung. Wie schon in der Einleitung und unter 2.3 beschrieben, vermutet Kowallik, daß dieser Effekt durch eine stimulierte Glykolsäureausscheidung verursacht werden könnte. Nach Abb.5 wird zwar in der Gärung von Scenedesmus 8 keinerlei Glykolsäure gebildet, um jedoch zu prüfen, ob die im Licht gesteigerte Milchsäureproduktion in irgendeinem Zusammenhang mit den von Kowallik gemachten Beobachtungen steht, wurde die Wirkung von Lichtwellenlangen aus dem blauen und roten Bereich des sichtbaren Spektrums untersucht und verglichen.

Nach den beiden in Abb.6 dargestellten Versuchen wird die D-Milchsäurebildung sowohl durch Blaulicht (454 nm)

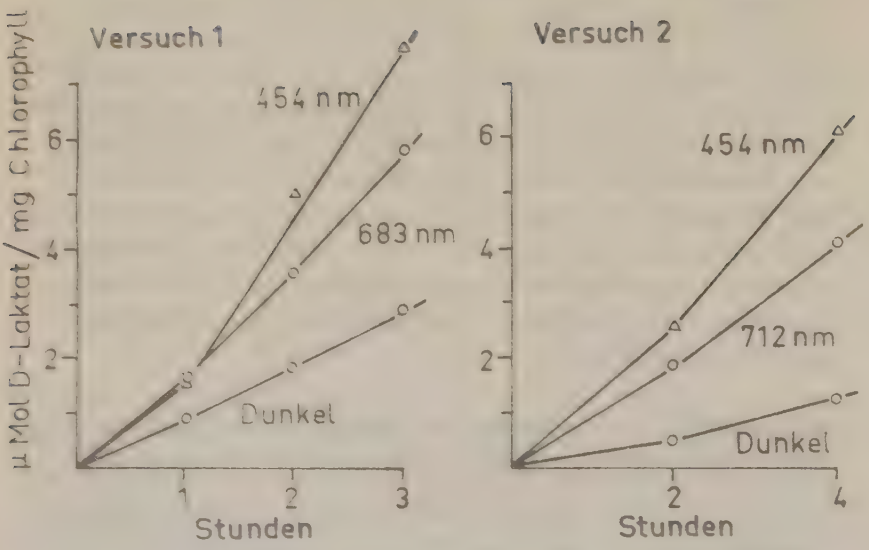

Abb. 6: Wirkung von monochromatischem Licht auf die D-Laktatbildung von Scenedesmus 8

Algendichte 185 µg Chl./ml (Versuch 1) und 260 µg Chl./ml (Versuch 2), Lichtintensität 6500 erg/cm^2·sec

als auch durch Rotlicht (683 nm und 712 nm) gefördert, wobei Blaulicht am wirksamsten ist. Die Tatsache steht im Gegensatz zu den von Kowallik gemachten Beobachtungen und soll an anderer Stelle diskutiert werden.

Die Gärungsraten von Scenedesmus 8 waren trotz der Verwendung von gleichalten Kulturen sehr unterschiedlich. Häufig trat bei hohen Dunkelraten im Licht nur eine geringe D-Laktatförderung auf. Es war deshalb unmöglich

eine genaue Lichtsättigungskurve aufzustellen. Eine gewisse Einordnung der Lichtsättigung des Förderungseffektes soll ein Vergleich mit der Hemmung der D-Milchsäurebildung beim Scenedesmus Wildtyp bringen, die etwa dieselbe Sättigung wie die anaerobe Glucoseassimilation zeigt.

Tab.9: Vergleich von Förderung (Scenedesmus 8) und Hemmung (Scenedesmus Wildtyp) der D-Laktatbildung bei zwei Lichtintensitäten

	Scenedesmus Wildtyp	Scenedesmus 8
Lichtintensität	% der Dunkelrate	
3000 erg/cm^2·sec	45	236
6000 erg/cm^2·sec	20	230

Algendichte in beiden Experimenten 260 µg Chl./ml, die angegebenen Werte wurden aus den nach 2 und 4 Stunden erfolgten D-Laktatbestimmungen errechnet.
Rotlicht RG 665

Nach Tabelle 9 ist die Förderung der D-Laktatausscheidung von Scenedesmus 8 bereits bei 3000 erg/cm^2·sec Rotlicht gesättigt, die Hemmung der D-Laktatbildung vom Scenedesmus Wildtyp dagegen erhöht sich beim Übergang von 3000 zu 6000 erg/cm^2·sec von 55% auf 80%. Danach ist die D-Laktatförderung von Scenedesmus 8 auf alle Fälle früher gesättigt als die Hemmung der D-Laktatbildung des Scenedesmus Wildtyp und damit auch früher als die zyklische Photophosphorylierung. Diese Eigenschaft steht nun eher im Einklang mit der Blaulichtstimulierten Ansäuerung und Atmungssteigerung. Nach Kowallik (1969 a) ist die letztere bei Chlorella vulgaris früher gesättigt als die ebenfalls beobachtete Atmungshemmung, die auch hier durch zyklische Photophosphorylierung verursacht werden soll.

2.5 Wirkung von DCMU auf die lichtabhängige D-Laktat-Stimulierung

Da sowohl Wellenlängen aus dem blauen als auch aus dem roten Spektralbereich bei Scenedesmus 8 eine Förderung der D-Laktatbildung bewirken, mußte die Möglichkeit einer Beteiligung der Photosynthese bezw. photosynthetischer Elektronentransporte an dieser Stimulierung in Betracht gezogen werden. Da Scenedesmus 8 nur

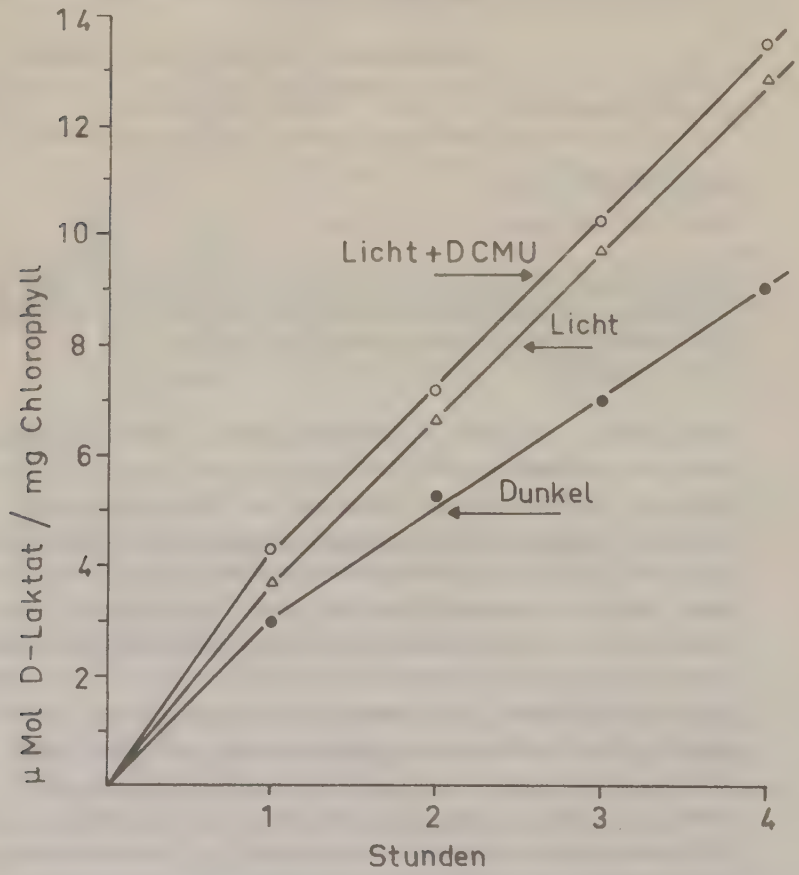

Abb.7: Wirkung von DCMU auf die lichtstimulierte D-Laktatbildung von Scenedesmus 8

Algendichte 220 µg Chl./ml, DCMU-Konzentration 2×10^{-6} M, Lichtintensität 6500 erg/ $cm^2 \cdot sec$ (Weißlicht)

noch Lichtreaktion II besitzt, sollte geprüft werden, ob der spezifische Hemmstoff der Lichtreaktion II, DCMU, (siehe dazu Teil I) die Förderung der D-Laktatbildung beeinflussen kann.

$2x10^{-6}$ M DCMU hat nach Abb.7 keinerlei Einfluß auf die lichtstimulierte D-Laktatbildung, ein Zusammenhang zwischen Gärungsstimulierung und Photosynthese ist demnach unwahrscheinlich.

2.6 Gärungsstimulierung im Licht-Dunkelwechsel

Nach 1.3 ist die Hemmung der D-Laktatausscheidung der Mutante 11 durch Licht reversibel, d.h. beim Lichtausschalten steigt die Gärung in kurzer Zeit wieder zur Dunkelkontrollrate an. Zur weiteren Charakterisierung der lichtstimulierten D-Milchsäureausscheidung sollte auch sie im Licht-Dunkelwechsel untersucht werden.

Abb.8 zeigt die normalerweise auftretende starke Stimulierung der D-Laktatausscheidung sowohl im Blau- als auch im Rotlicht. Nach zwei Stunden wurde bei den beiden "Lichtküvetten" das Licht ausgeschaltet. Es war interessant zu sehen, daß im Gegensatz zur beschriebenen Hemmung der D-Laktatbildung bei der Mutante 11 diese stimulierten Raten im Dunkeln über zwei Stunden konstant blieben. Licht scheint demnach in der Förderung der exogenen Gärung eine aktivierende Rolle zu spielen. Diese Tatsache schließt, wie die in 2.5 beschriebene Unempfindlichkeit gegenüber DCMU, eine Beteiligung der Photosynthesepigmente an diesem Effekt mit Sicherheit aus. Sie steht jedoch wiederum im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kowallik (1969 b), wonach die lichtstimulierte Ansäuerung der gelben Chlorellamutante unmittelbar nach dem Lichtausschalten zur endogenen Dunkelrate abfällt. Auch die in derselben Mutante beobachtete Blaulicht-stimulierte endogene Atmungssteigerung erreicht im nachfolgenden Dunkel bereits nach 15-30 Minuten wieder die endogene Dunkelrate.

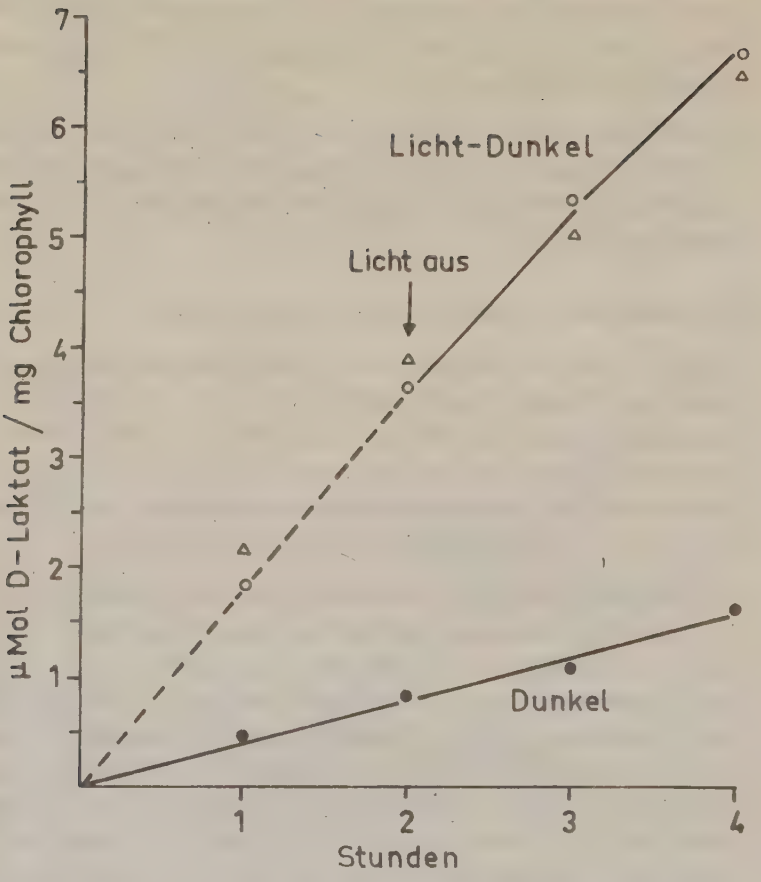

Abb.8: Lichtstimulierte D-Laktatausscheidung von Scenedesmus 8 im Licht-Dunkelwechsel

Algendichte 220 µg Chl./ml, Lichtintensität 6500 erg/cm^2·sec, ○ Blaulicht (454 nm), △ Rotlicht (683 nm)

2.7 Wirkung von Licht auf Glykolysezwischenstoffe von Scenedesmus 8

Es stellte sich nun wiederum die Frage, an welcher Stelle Licht beschleunigend auf die Gärung von Scenedesmus 8 einwirkt. Nachdem sich durch die Messung glykoly-

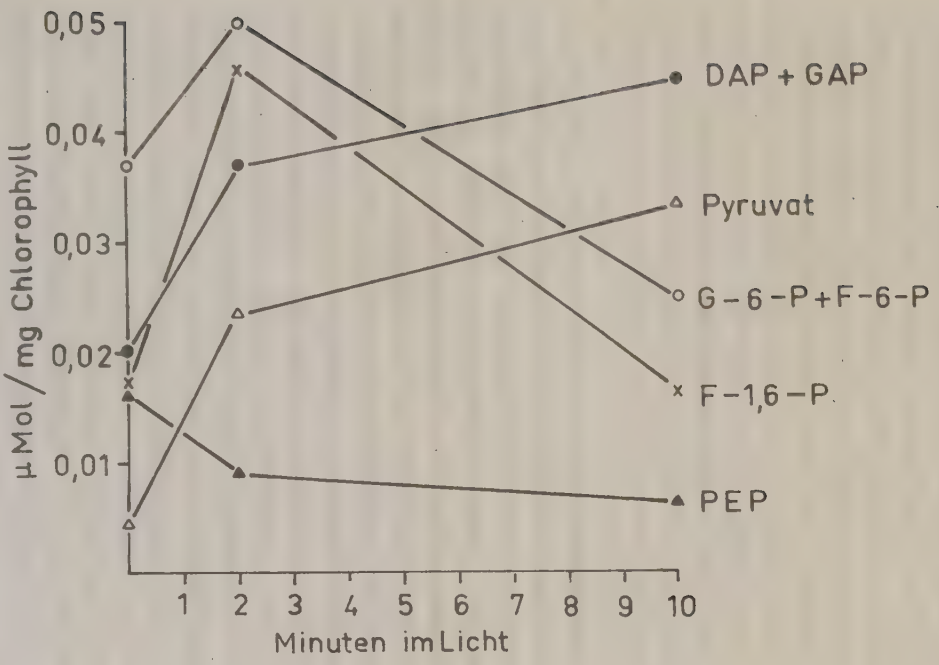

Abb.9: Veränderung von Glykolysezwischenstoffkonzentrationen im Dunkel-Lichtwechsel bei der Mutante 8

tischer Zwischenstoffe beim Scenedesmus Wildtyp und bei der Mutante 11 eine Beeinflussung der Phosphofructokinase klar zeigen ließ, sollte diese Methode auch bei der Scenedesmusmutante 8 für den "Förderungseffekt" angewandt werden. Da nach 2.6 Licht offensichtlich eine aktivierende Rolle spielt und bislang nicht klar war, ob diese Aktivierung unmittelbar oder erst nach einer gewissen Anlaufzeit ihre Wirkung zeigt, war es nicht sicher, ob bei der Mutante 8 kurzfristige Veränderungen in den Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel-Lichtwechsel auftreten. Bei einer Beschleunigung der glykolytischen Reaktionskette an einer bestimmten Stelle sollte sich in diesem Fall ein Abfall in der Konzentration des vor dieser Stelle liegenden Substrates ergeben, die Konzentration des nachfolgenden Zwischenstoffes sollte dagegen ansteigen.

Die Nullminutenwerte der Abb.9 geben wiederum die Konzentrationen der Zwischenstoffe im stationären Fließgleichgewicht im Dunkeln an. Innerhalb von zwei Minuten im Licht treten starke Veränderungen in diesen Konzentrationen auf, was gegen eine lange Anlaufzeit in der Aktivierung spricht. Die Tatsache, daß sowohl die Zuckermonophosphate als auch Fructosediphosphat und die Triosephosphate innerhalb von zwei Minuten stark ansteigen, könnte eine gesteigerte Substratanlieferung zur Ursache haben. Diese wäre einmal durch eine gesteigerte Hexokinaseaktivität möglich, daneben könnte Licht eine Beschleunigung des Glucoseaufnahmesystems verursachen oder eine zusätzliche Mobilisierung endogener Reservestoffe bewirken. Außerdem deuten der Abfall im Phosphoenolpyruvat und der gleichzeitige Anstieg im Pyruvat innerhalb von zwei Minuten möglicherweise auf eine Beschleunigung der Pyruvatkinase hin. Die nach zwei Minuten auftretenden Veränderungen in den Zwischenstoffkonzentrationen zeigen wahrscheinlich die Einstellung neuer "steady state"-Konzentrationen. Es ist allerdings bei einer gesteigerten Substratanlieferung vor der Hexokinasereaktion unerklärlich, warum die

Zuckermonophosphat- und Fructosediphosphatkonzentrationen nach zehn Minuten niedriger als im vorherigen Dunkeln liegen.

2.8 Einfluß von Licht auf die Aufnahme von Glucoseanalogen

Die Stimulierung der endogenen Atmung oder der anaeroben Ansäuerung durch Blaulicht erscheint nach Kowallik und Gaffron (1967) und Kowallik (1969 b) immer erst nach einer Lagphase von ca 10 Minuten. Die Veränderungen in den Glykolysezwischenstoffkonzentrationen der Mutante 8 beim Dunkel-Lichtwechsel deuten darauf hin, daß die Stimulierung der Gärung möglicherweise ohne Lag einsetzt. Nach Tanner (1969) ist Chlorella vulgaris in der Lage 3-O-Methylglucose über ein induzierbares Hexoseaufnahmesystem aufzunehmen, wobei 99% der aufgenommenen Radioaktivität in der Zelle unverändert als 3-O-Methylglucose vorliegt. Diese Aufnahme wird unter anaeroben Bedingungen durch Licht stimuliert. Nach 2.1 besitzt Scenedesmus 8 eine lichtabhängige Glucoseaufnahme, die wahrscheinlich durch eine stimulierte Gärung verursacht wird. Wenn 3-O-Methylglucose-^{14}C auch von Scenedesmus 8 aufgenommen wird, dann sollte sich die Anlaufphase der Gärungsstimulierung durch eine gesteigerte parallellaufende 3-MG-^{14}C-Aufnahme einfach zeigen lassen, da dieser Zucker nicht metabolisiert wird. Die Glucose-u-^{14}C-Aufnahme eignet sich in diesem Fall nicht für die Membranfilter-Methode (siehe Material und Methoden), da Glucose einmal in schwer extrahierbare Polysaccharidfraktionen eingebaut wird, zum anderen wird ein großer Teil an Radioaktivität während der anaeroben Inkubation als Säuren wieder ausgeschieden.

Nach Abb.10 genügt bei Scenedesmus 8 die durch endogene Gärung im Dunkeln gewonnene Energie eine 3-O-MG-Aufnahme zu bewirken. Durch Blaulicht findet sich eine Steigerung dieser Aufnahme, die offensichtlich ohne Verzögerung einsetzt, was die, anhand der raschen Veränderungen in den Zwischenstoffkonzentrationen beim Lichteinschalten auf-

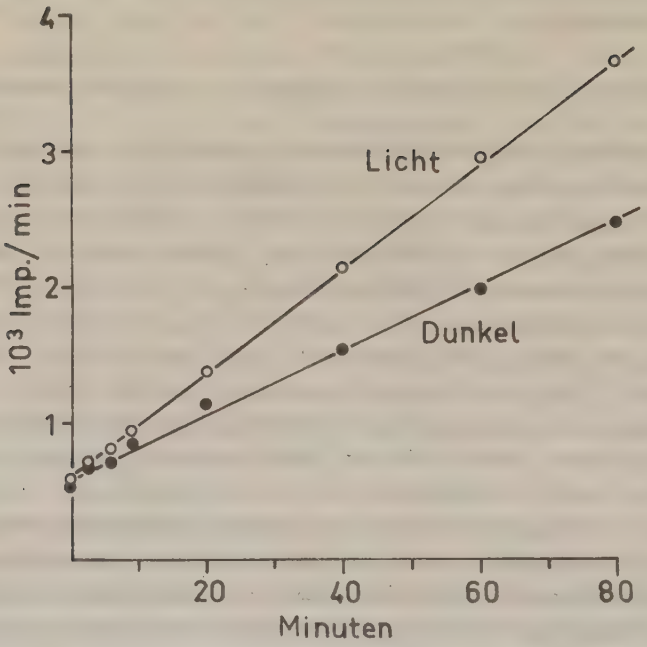

Abb.10: Wirkung von Licht auf die anaerobe 3-O-Methylglucose-^{14}C-Aufnahme der Scenedesmusmutante 8
Algendichte 260 µg Chl./ml, Lichtintensität 7000 erg/cm^2·sec (Blaulicht 454 nm)

gestellte Vermutung bestätigt. Es handelt sich demnach bei der Lichtaktivierung sicher um keine durch Licht induzierte Enzymneusynthese, bei der eine längere Lag zu erwarten gewesen wäre. So tritt z.B. bei der, durch Actidion hemmbaren Induzierung des Hexoseaufnahmesystems von Chlorella vulgaris eine Lag von ca 60 Minuten auf (Tanner und Kandler 1967). Die Gärungsstimulierung durch Licht könnte deshalb eher durch die Aktivierung schon vorhandener Enzyme verursacht werden, die offensichtlich rasch erfolgen kann.

Die Stimulierung der Energie-abhängigen 3-MG-^{14}C-Aufnahme durch Licht könnte nun einerseits durch eine Stimulierung der endogenen Gärung und einer damit verbundenen gesteigerten glykolytischen ATP-Produktion verursacht werden, wie es unter 2.1 für die gesteigerte Glucoseaufnahme gefordert wird, zum anderen könnte Licht in irgendeiner Weise eine Beschleunigung des Hexoseaufnahmesystems ohne Beteiligung von glykolytischem ATP bewirken. Um eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten fällen zu können, wurden 2-Desoxyglucose-^{14}C-Aufnahmeversuche durchgeführt. Nach Komor und Tanner (1971) wird auch dieser Zucker wie 3-MG über dasselbe Hexoseaufnahmesystem aufgenommen, im Unterschied zur 3-MG wird jedoch dabei ein Teil dieses Zuckers phosphorylliert. Diese Phosphorylierung erfolgt allerdings nicht im Zuge der aktiven Aufnahme. Sollte die lichtstimulierte 3-MG-^{14}C-Aufnahme durch eine reine Beschleunigung des Aufnahmesystems ohne eine gesteigerte glykolytische ATP-Produktion verursacht worden sein, so sollte sich bei der 2-DG-^{14}C-Aufnahme der Mutante 8 im Licht keine Veränderung oder unter Umständen eine Erniedrigung im Prozentanteil der Radioaktivität des phosphorylierten Zukkers an der aufgenommenen Gesamtradioaktivität ergeben. Bei einer gesteigerten ATP-Produktion allerdings wäre eine Erhöhung dieses Prozentanteils zu erwarten.

Die Nullminutenwerte der Tabelle 10 geben die aufgenommenen Gesamtradioaktivitäten nach 10 Minuten Dunkelvorinkubation vor dem Lichteinschalten an. Da bereits zu diesem Zeitpunkt in der "Lichtküvette" die Algen gut doppelt soviel Radioaktivität aufgenommen haben, was bei diesem Versuch unerklärlich ist, kann der Stimulierungsgrad der 2-DG-^{14}C-Aufnahme durch Licht anhand der nachfolgenden Werte nicht bestimmt werden. Diese Tatsache ist allerdings für die Lösung der Fragestellung nicht so wichtig, interessant an diesem Experiment ist allerdings, daß sich im Licht im Gegensatz zur Dunkelprobe zu jedem Zeitpunkt ein größerer Prozentanteil an phos-

Tab. 10: Wirkung von Licht auf den Prozentanteil von phosphorylierter 2-Desoxyglucose-^{14}C an der aufgenommenen Gesamtradioaktivität bei der Mutante 8

	Dunkelprobe		Lichtprobe	
	Aufgenommene Gesamtradioaktivität	%Anteil an phosphorylierter 2-DG-^{14}C	Aufgenommene Gesamtradioaktivität	%Anteil an phosphorylierter 2-DG-^{14}C
Minuten	Imp/min	%	Imp/min	%
0	187	20	403	25
20	434	36	732	42,5
40	565	37	1104	41,5
80	730	36	1495	44,5

Algendichte 260 µg Chl./ml, Lichtintensität 7000 erg/cm^2·sec (Blaulicht 454 nm)

phorylierter 2-DG-^{14}C findet. Aus diesem Grund muß angenommen werden, daß Licht tatsächlich in diesem Fall eine Beschleunigung der endogenen Gärung verursacht, die eine gesteigerte 2-DG-^{14}C- und 3-MG-^{14}C-Aufnahme durch eine damit verbundene gesteigerte glykolytische ATP-Produktion zur Folge hat.

D. SCHLUSSBETRACHTUNG

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Licht die Gärung von Scenedesmus in unterschiedlicher Weise beeinflussen kann. Beim Scenedesmus Wildtyp und bei der Mutante 11 bewirkt Licht unter anaeroben Bedingungen eine nahezu völlige Blockierung der exogenen und endogenen Gärung, gemessen als gehemmte D-Milchsäureausscheidung, CO_2-Entwicklung oder pH-Verschiebung. Die sehr frühe Lichtsättigung dieser Hemmung, die Tatsache, daß sie auch in der Mutante 11 auftritt und beim Wildtyp auch durch Wellenlängen >700 nm hervorgerufen wird, stützen die Vermutung, daß diese Hemmung Photosystem I-abhängig ist. Dieselben Merkmale besitzt auch die vielfach beobachtete Atmungshemmung bei einzelligen Algen. So ist die bei Anacystis nidulans (Hoch et al. 1963) und Chlorella vulgaris (Govindjee et al. 1963) beobachtete Atmungshemmung bereits bei sehr niedrigen Lichtintensitäten gesättigt, wobei Licht um 700 nm besonders wirksam ist. Ähnliche Eigenschaften weisen auch die Transients T_3 und T_4 von Chlorella fusca (Ried 1968) auf und die lichtabhängige Atmungshemmung von Chlorella pyrenoidosa bei DCMU-gehemmter Photosynthese (Kowallik 1969 a). Auf Grund dieser Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen dürfte es sicher sein, daß diese Atmungshemmung, wie auch schon von den genannten Autoren vermutet, durch eine Blockierung der Glykolyse durch Licht verursacht wird. Ein reduzierter Glykolysedurchsatz muß auch eine Hemmung des Tricarbonsäurezyklus und eine Verringerung des in ihm gebildeten Atmungssubstrates zur Folge haben. Eine Hemmung des Tricarbonsäurezyklus im Licht wurde bereits mehrfach beschrieben (Ducet und Rosenberg 1962, Marsh et al. 1963).

Sehr wahrscheinlich erfolgt die Hemmung der Glykolyse des Scenedesmus Wildtyp und der Mutante 11 durch einen, unter anaeroben Bedingungen durch zyklische Photophosphorylierung hervorgerufenen Pasteur-ähnlichen Effekt. Diese Vorstellung wird durch die Beobachtung gestützt, daß einmal die Hemmung der D-Milchsäureausscheidung durch Licht im nachfolgenden Dunkeln rasch wieder verschwindet und sich zum anderen beim Dunkel-

Lichtwechsel ein Anstieg in den Zuckermonophosphaten und ein Abfall im Fructosediphosphat ergibt. Diese Zwischenstoffkonzentrationsänderungen sind durch eine Blockierung der Phosphofructokinase durch Licht zu erklären. Auf Grund des raschen Austausches von ATP zwischen Zytoplasma und den Chloroplasten (Santarius und Heber 1965) wird diese Hemmung der Phosphofructokinase mit großer Wahrscheinlichkeit durch ein im Licht erhöhtes ATP-Niveau verursacht. Daß auch Pflanzenphosphofructokinasen durch erhöhte ATP-Konzentrationen hemmbar sind, ist hinreichend bekannt (Lowry und Passoneau 1964, Dennis und Coultate 1966). Der beim Scenedesmus Wildtyp und bei der Mutante 11 gefundene Abfall im Fructosediphosphat beim Dunkel-Lichtwechsel steht im Gegensatz zu dem von Kandler und Haberer-Liesenkötter (1963) unter ähnlichen Bedingungen beobachteten Abfall beim Licht-Dunkelwechsel, der wie unter aeroben Bedingungen eine im Licht vorhandene Hemmung der Triosephosphatoxidation widerspiegeln soll. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, daß tatsächlich bei Chlorella nach der Phosphofructokinasereaktion ein Regulationspunkt in der glykolytischen Reaktionskette existiert, der durch Licht beeinflußt werden kann. Ein manchmal auch beim Scenedesmus Wildtyp und bei der Mutante 11 gefundener leichter Anstieg in den Triosephosphaten beim Dunkel-Lichtwechsel könnte in ähnlicher Weise gedeutet werden.

Nach Healey und Myers (1971) soll der Kok-Effekt in Chlamydomonas reinhardi nicht durch eine Zusammenwirkung zwischen zyklischer Photophosphorylierung und oxidativer Phosphorylierung verursacht werden. Sie schließen dies mit aus der Tatsache, daß der Kok-Effekt und ein durch die Hemmung der Atmung im Licht verursachter Transient im Sauerstoffaustausch (Transient T_3 von Ried 1968) in Chlamydomonas durch CCP nicht aufgehoben werden kann. Die Ursache für die Atmungshemmung im Licht liegt nach ihrer Meinung in einer Konkurrenz zwischen Photosystem I und der Atmungskette um $NADH_2$ (durch eine Photosystem I-abhängige Oxidation von $NADH_2$). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß CCP neben seiner Entkopplerwirkung auf die oxidative Phosphorylierung auch Substratketten-

phosphorylierungen blockieren kann. Es ist deshalb ratsam, mit diesem Gift gewonnene Ergebnisse, mit Vorsicht zu behandeln. Die beim Scenedesmus Wildtyp und bei der Mutante 11 gefundene Blockierung der Phosphofructokinase kann allerdings sicher nicht mit einer Photosystem I-abhängigen Oxidation von, in diesem Fall in der Glykolyse gebildeten $NADH_2$ erklärt werden. Sie wird sicher durch ein im Licht erhöhtes ATP-Niveau verursacht. Daneben kann die Tatsache, daß in der zur Photophosphorylierung unfähigen Mutante 8 keine Gärungshemmung auftritt, als Hinweis für eine Beteiligung der Photophosphorylierung an der Hemmung beim Scenedesmus Wildtyp und bei der Mutante 11 betrachtet werden.

In der Mutante 8 bewirkt Licht, im Gegensatz zum Wildtyp und zur Mutante 11, eine Stimulierung der Gärung, gemessen als gesteigerte Säurenproduktion oder pH-Verschiebung. Es war in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, ob dieser Lichteffekt in irgendeinem Zusammenhang mit der mehrfach beobachteten Blaulicht-abhängigen endogenen Atmungs- und Gärungsstimulierung steht. Im Gegensatz zur Blaulicht-gesteigerten Ansäuerung in einer gelben Chlorellamutante (Kowallik 1969 b), trat bei Scenedesmus 8 nicht nur im Blau- sondern auch im Hell- und Dunkelrotlicht eine stimulierte D-Milchsäureausscheidung auf. Eine durch Licht hervorgerufene gesteigerte Glykolatausscheidung, wie sie von Kowallik als Ursache für die gesteigerte Ansäuerung vermutet wird, war in der Gärung von Scenedesmus 8 nicht nachweisbar. Da bei Scenedesmus 8 sowohl Blau- als auch Rotlicht eine Steigerung der D-Laktatbildung bewirken, kommt ein Flavin als absorbierendes Pigment, wie es für die Blaulicht-stimulierte Atmungs- und Gärungssteigerung vermutet wird, sicher nicht in Frage. Zunächst wurde die Beteiligung von Photosynthesepigmenten in Betracht gezogen. Die extrem frühe Lichtsättigung, die DCMU-Unempfindlichkeit und die Tatsache, daß die lichtgesteigerte D-Milchsäurebildung im nachfolgenden Dunkeln über zwei Stunden unverändert anhält, läßt diese Möglichkeit jedoch als unwahrscheinlich erscheinen. Bertsch (1963) konnte zeigen, daß die durch Blaulicht hervorgerufene Wachstumshemmung etiolierter Erbsenstammsegmente durch Dunkelrot-

licht verringert werden kann. Dieses Ergebnis zeigt, daß auch Blaulicht über das Phytochromsystem physiologische Prozesse beeinflussen kann. Nach Siegelman und Firer (1964) zeigt das Absorptionsspektrum von gereinigtem Phytochrom sowohl für P_{HR} als auch für P_{DR} deutliche Peaks um 400 nm. Eine Beteiligung des Phytochromsystems an der durch Blau- und Rotlicht hervorgerufenen Gärungssteigerung in Scenedesmus 8 ist demnach nicht ausgeschlossen.

Das lange Anhalten der lichtstimulierten D-Milchsäureausscheidung im nachfolgenden Dunkeln deutet darauf hin, daß Licht eine aktivierende Rolle ausübt. Durch 3-MG-^{14}C-Aufnahmeversuche konnte gezeigt werden, daß die Gärungsstimulierung bei der Mutante 8, die eine im Licht gesteigerte 3-MG-Aufnahme zur Folge hat, ohne Lagphase einsetzt. Es handelt sich bei der Lichtaktivierung deshalb sicher nicht um eine lichtinduzierte Proteinneusynthese. Versuche, die im Ergebnisteil nicht beschrieben wurden, haben auch gezeigt, daß Actidion, ein wirkungsvolles Proteinbiosynthesegift, keinerlei Hemmung der lichtstimulierten D-Laktatausscheidung von Scenedesmus 8 verursacht. Es ist deshalb möglich, daß Licht in diesem Fall schon vorhandene Enzyme aktiviert.

Über den genauen Wirkungsort von Licht in der Gärungsstimulierung der Mutante 8 können bislang nur Vermutungen geäußert werden. 2-DG-^{14}C-Aufnahmeversuche haben gezeigt, daß Licht keine direkte Stimulierung des Hexoseaufnahmesystems bewirkt. Der im Licht erhöhte Anteil von phosphorylierter 2-DG-^{14}C an der aufgenommenen Gesamtradioaktivität spricht für eine tatsächliche Beschleunigung der Gärung, die durch eine gesteigerte glykolytische ATP-Produktion, eine lichtabhängige anaerobe Zuckeraufnahme zur Folge hat. Veränderungen in den Glykolysezwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel-Lichtwechsel könnten durch eine im Licht gesteigerte Hexokinase- und Pyruvatkinaseaktivität gedeutet werden, zum anderen wäre eine beschleunigte endogene Substratanlieferung möglich. Interessant war in diesem Zusammenhang, daß von Laudenbach und Pirson (1969), die bei Chlorella beobachtete Blaulicht-abhängige Atmungssteige-

rung durch ein erhöhtes Substratniveau verursacht werden soll. Sie folgern dies aus der Tatsache, daß Blaulicht spezifisch den Abbau gespeicherter Kohlenhydrate fördert und diskutieren eine Erhöhung der Permeabilität der Plastidenmembran durch Blaulicht als Ursache für diesen Effekt.

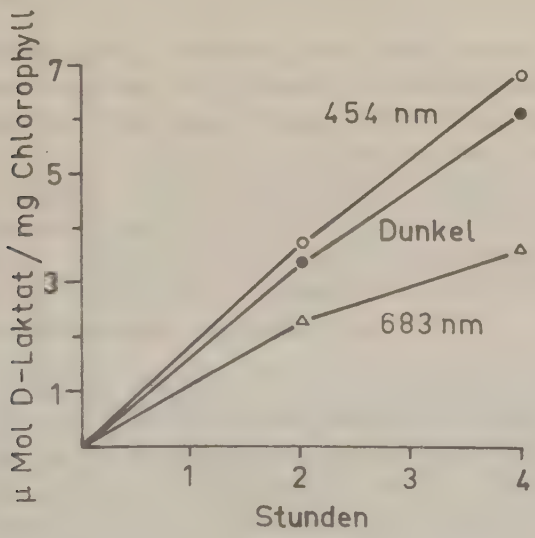

Abb.11: Wirkung von monochromatischem Licht auf die D-Laktatbildung von Scenedesmus 11
Algendichte 260 µg Chl./ml, Lichtintensität 7500 erg/cm^2·sec

Die bisher beschriebenen und diskutierten Ergebnisse zeigten, daß der Hemmeffekt von Licht auf die Gärung eines Organismus mit seiner Fähigkeit zur Photophosphorylierung gekoppelt ist, und eine Gärungssteigerung durch Licht nur dann ersichtlich wird, wenn diese Fähigkeit verlorengegangen ist, wie in der Mutante 8. Es liegt jedoch nahe, daß in Organismen, die photophosphorylieren können, zwischen diesen beiden antagonistischen Mechanismen ein ausgewogenes Zusammenspiel besteht. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, daß in der Scenedesmusmutante 11, wo Weißlicht und Rotlicht die Gärung

normalerweise hemmen, Blaulicht bestimmter Intensitäten sogar eine Förderung der D-Laktatbildung bewirken kann (Abb.11).

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei der Vergärung exogen gebotener Glucose tritt bei Scenedesmus als wichtiges Produkt D-Milchsäure auf. Die anaerobe D-Milchsäureausscheidung wird sowohl beim Scenedesmus Wildtyp als auch bei der Mutante 11 durch Licht stark gehemmt, beim Wildtyp etwa zu 95%, bei der Mutante zu 75%.

2. Die Hemmung der D-Milchsäurebildung ist bei der Mutante 11 genauso früh wie die anaerobe Photoassimilation von Glucose etwa bei 2000 Lux lichtgesättigt. Daneben wird bei dieser Mutante auch die alkoholische Gärung, gemessen als CO_2-Entwicklung, durch Licht reduziert. Beim Scenedesmus Wildtyp bewirkt auch Licht der Wellenlänge 712 nm eine vollständige Hemmung der anaeroben D-Laktatbildung. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Hemmung der D-Milchsäureausscheidung Photosystem I-abhängig ist.

3. Ein Vergleich zwischen der D-Milchsäureausscheidung und der pH-Verschiebung bei der Mutante 11 zeigt, daß in der Gärung von Scenedesmus auch noch andere Säuren gebildet werden. Es wurde festgestellt, daß die Bildung dieser Säuren durch Licht in gleicher Weise gehemmt wird wie die D-Milchsäureproduktion. Die D-Laktatausscheidung beträgt sowohl im Licht als auch im Dunkeln etwa 20-30% der Gesamtsäurenproduktion und kann deshalb als guter Indikator für die Gärung von Scenedesmus verwendet werden.

4. Die Hemmung der anaeroben D-Laktatbildung durch Licht ist reversibel. Sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante 11 findet sich beim Dunkel-Lichtwechsel ein kräftiger Anstieg in den Zuckermonophosphaten und ein leichter Abfall im Fructosediphosphat, was eine Hemmung der Phosphofructokinase durch Licht widerspiegelt. Beide Befunde deuten auf einen, durch Lichtphosphorylierung hervorgerufenen Pasteur-ähnlichen Effekt hin.

5. CCP hemmt die anaerobe Dunkelglucoseaufnahme der Mutante 11 zu 94,5% und die Laktatausscheidung zu 76,5%. Die endogene

Gärung des Scenedesmus Wildtyp wird sowohl im Dunkeln als auch im Licht durch CCP stark gefördert. Die genaue Ursache dieses Effektes bleibt ungelöst.

6. Die D-Laktatbildung der Scenedesmusmutante 8 wird nur durch aerobe Bedingungen stark gehemmt. Im Licht unter N_2 findet sich keine Hemmung, sondern eine starke Steigerung der D-Laktatausscheidung. Dieses Ergebnis wird als weiterer Hinweis gewertet, daß der Hemmeffekt von Licht auf die Glykolyse eines Organismus mit seiner Fähigkeit zur Photophosphorylierung gekoppelt ist.

7. Neben der Stimulierung der D-Laktatbildung der Mutante 8 findet sich auch eine Steigerung der anaeroben Glucoseaufnahme im Licht. Dabei wird für jedes zusätzlich im Licht zu Milchsäure umgewandelte Molekül Glucose ein weiteres assimiliert.

8. Ein Vergleich zwischen pH-Verschiebung und D-Laktatbildung zeigt, daß bei der Mutante 8 im Licht bevorzugt die Bildung von D-Milchsäure gefördert wird. Dies wird auch durch die Bestimmung aller sauren Gärungsprodukte der Mutante 8 durch Kieselgelsäulenchromatographie bestätigt. Es findet sich jedoch teilweise auch eine Stimulierung in der Essig- und Ameisensäure, die als weitere Hauptgärungsprodukte von Scenedesmus auftreten. Im Dunkeln werden Essig-, Ameisen- und Milchsäure etwa im Verhältnis 2:2:1 gebildet. Weder im Dunkeln noch im Licht konnte bei der Mutante 8 die Bildung von Glykolsäure nachgewiesen werden.

9. Sowohl Blaulicht als auch Rot- und Dunkelrotlicht bewirken bei Scenedesmus 8 eine Steigerung der D-Laktatbildung. Diese Steigerung ist noch früher lichtgesättigt als die Hemmung der D-Laktatbildung beim Scenedesmus Wildtyp.

10. DCMU hat keinerlei Hemmwirkung auf die lichtabhängige Förderung der D-Laktatbildung der Mutante 8. Die im Licht gesteigerte Rate hält im nachfolgenden Dunkeln über zwei Stunden unverändert an. Photosynthetische Elektronentransport-

wege sind demnach nicht an der Förderung der D-Laktatbildung beteiligt. Eine Beteiligung des Phytochromsystems wird in Erwägung gezogen.

11. In der Mutante 8 ergibt sich beim Dunkel-Lichtwechsel ein Anstieg in den Zuckermonophosphaten, im Fructosediphosphat, in den Triosephosphaten und im Pyruvat innerhalb von zwei Minuten. Gleichzeitig findet sich ein Abfall im Phosphoenolpyruvat. Licht könnte demnach eine Beschleunigung der Hexokinase und Pyruvatkinase oder eine gesteigerte endogene Substratanlieferung bewirken.

12. Die raschen Zwischenstoffkonzentrationsänderungen beim Dunkel-Lichtwechsel und das sofortige Einsetzen einer im Licht gesteigerten 3-MG-^{14}C-Aufnahme zeigen, daß die Gärungsstimulierung der Mutante 8 ohne Lagphase einsetzt.

13. Bei der 2-DG-^{14}C-Aufnahme der Mutante 8 findet sich im Licht ein größerer Prozentanteil an phosphorylierter 2-DG-^{14}C, bezogen auf die aufgenommene Gesamtradioaktivität. Die bei der Mutante beobachtete lichtgesteigerte Zuckeraufnahme wird deshalb sicher durch eine gesteigerte glykolytische ATP-Produktion und nicht durch eine reine Stimulierung des Hexoseaufnahmesystems verursacht.

14. Bei Scenedesmus 11 findet sich im Rotlicht wie im Weißlicht eine Hemmung der anaeroben D-Laktatausscheidung, Blaulicht bewirkt dagegen eine leichte Förderung. Diese Tatsache zeigt, daß auch in Organismen, die zur Photophosphorylierung fähig sind, ein Gleichgewicht zwischen den beiden antagonistischen Lichteffekten besteht.

LITERATURVERZEICHNIS

Amesz, J., Bos, van den P. und M.P. Dirks, Biochim. Biophys. Acta 197 (1970) 324

Arnon, D.I., Plant Physiol. 24 (1949) 1

Arnon, D.I., Whatley, F.R. und M.B.Allen, Science 127 (1958) 1026

Arnon, D.I., Nature 184 (1959) 10

Arnon, D.I., in: A Symposium on Light and Life, W.D. Mc. Elroy und B. Glass, eds., The Johns Hopkins Press, Baltimore (1961) 489

Arnon, D.I., Losada, M., Whatley, F.R. und H.Y. Tsujimoto, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47 (1961) 1314

Arnon, D.I., Tsujimoto, H.Y. und B.D. Mc. Swain, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51 (1964) 1274

Arnon, D.I., Tsujimoto, H.Y. und B.D. Mc. Swain, Nature 214 (1967) 562

Asahi, T. und H.T. Jagendorf, Arch. Biochem. Biophys. 100 (1963) 531

Avron, M. und N. Shavit, Biochim. Biophys. Acta 109 (1965) 317

Bassham, J.A. und M. Kirk, Biochem. Biophys. Res. Commun. 9 (1962) 376

Batra, P.T. und A.T. Jagendorf, Plant Physiol. 40 (1965) 1074

Begum, F. und P.J. Syrett, Arch. Mikrobiol. 72 (1970) 344

Beinert, H. und B. Kok, in: Photosynthetic Mechanism in Green Plants, Publ. 1145, Natl. Acad. Sci. U.S., Natl. Res. Council, Washington (1963) 131

Bergmeyer, M.V., Methoden der Enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim (1966)

Bertsch, W.F., Amer. J. Bot. 50 (1963) 754

Bielawski, J., Thompson, T.E. und A.L. Lehninger, Biochem. Biophys. Res. Commun. 24 (1966) 948

Bishop, N.I., Biochim. Biophys. Acta 27 (1958) 205

Bishop, N.I., Biochim. Biophys. Acta 51 (1961) 323

Bishop, N.I., Nature 195 (1962) 55

Bishop, N.I., Science 140 (1963) 1095

Bishop, N.I., Photochem. Photobiol. 6 (1967) 621

Bishop, N.I. und J. Wong, Biochim. Biophys. Acta 234 (1971) 433

Böhme, H., Reimer, S. und A. Trebst, Z. Naturforsch. 26 b (1971) 341

Butler, W.L. und N.I. Bishop, in: Photosynthetic Mechanism in Green Plants, Publ. 1145, Natl. Acad. Sci. U.S., Natl. Res. Council, Washington (1963) 441

Butt, V.S. und M. Peel, Biochem. J. 88 (1963) 31

Calvin, M., in: Proc. Third Intern. Cong. Biochemistry, Brussels 1955, Acad. Press, New York (1956) 211

Casper, R. und A. Pirson, Haw. Flora (Jena) A 156 (1965) 177

Chance, B. und G.R. Williams, Adv. Enzymol. 17 (1956) 65

Cheniae, G.M. und I.F. Martin, Biochim. Biophys. Acta 197 (1970) 219

Clauss, H., Protoplasma 65 (1968) 49

Coombs, J. und C.P. Whittingham, Proc. Roy. Soc. Lond. 165 B (1966) 511

Cramer, W.A. und W.L. Butler, Biochim. Biophys. Acta 172 (1969) 503

Dam, K. van und E.C. Slater, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58 (1967) 2015

Dawkins, M.J.R., Judah, J.D. und K.R. Rees, Biochem. J. 76 (1960) 200

Decker, J.P., Plant Physiol. 30 (1955) 82

Del Campo, F.F., Ramírez, J.M. und D.I. Arnon, J. biol. Chem. 243 (1968) 2805

Dennis, D.T. und T.P. Coultate, Biochem. Biophys. Res. Commun. 25 (1966) 187

Dilley, R.A. und L.P. Vernon, Biochemistry 3 (1964) 817

Ducet, G. und A.J. Rosenberg, Annu. Rev. Plant Physiol. 13 (1962) 171

Duysens, L.N.M., Amesz, J.A. und B.M. Kamp, Nature 190 (1961) 510

Duysens, L.N.M., Colloques Internat. Centre Natl. Rech. Sci. 119 (1963 a) 75

Duysens, L.N.M., in: Photosynthetic Mechanism in Green Plants, Publ. 1145, Natl. Acad. Sci. U.S., Natl. Res. Council, Washington (1963 b) 1

Duysens, L.N.M. und H.E. Sweers, in: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Special issue of Plant and Cell Physiol., Japan. Soc. of Plant Physiologists, Tokyo (1963) 353

Elstner, E.F., Heupel, A. und S. Vaklinova, Z. Pflanzenphysiol. 62 (1970) 173

Emerson, R. und C.M. Lewis, Amer. J. Bot. 30 (1943) 165

Emerson, R., Chalmers, R.V. und C. Cederstrand, Science 125 (1957) 746

Emmelot, P. und C.J. Bos, Brit. J. Cancer 13 (1959) 520

Fan, H.N. und W.A. Cramer, Biochim. Biophys. Acta 216 (1970) 200

Folin, O. und H. Wu, J. biol. Chem. 83 (1929) 83

Fork, D.C. und Y. De Kouchkovsky, Photochem. Photobiol. 5 (1966) 609

Forrester, M.L., Krotkov, G. und C.D. Nelson, Plant Physiol. 41 (1966) 428

Forti, G. und B. Parisi, Biochim. Biophys. Acta 71 (1963) 1

Fowler, C.B., Biochim. Biophys. Acta 7 (1951) 563

Gaffron, H., Biol. Zentr. 59 (1939) 288

Gaffron, H., Amer. J. Bot. 27 (1940) 273

Gaffron, H., J. Gen. Physiol. 26 (1942 a) 195

Gaffron, H., J. Gen. Physiol. 26 (1942 b) 241

Gaffron, H., J. Gen. Physiol. 28 (1945) 269

Galeotti, T., Kováč, L. und B. Hess, Nature 218 (1968) 194

Genevois, L., Biochem. Z. 186 (1927) 461

Gibbs, M., Ann. New York Acad. Sci. 168 (1969) 356

Gingras, G., Goldsby, R.A. und M. Calvin, University of California, Radiation Laboratory Quaterly Report, UCRL-9652 (1960)

Gingras, G., Goldsby, R.A. und M. Calvin, Arch. Biochem. Biophys. 100 (1963) 178

Gingras, G., Étude comparative, chez quelques algues, de la photosynthèse et de la photoréduction réalisée en présence d'hydrogène, Dissertation, Univ. Paris (1966)

Goldsworthy, A., Phytochemistry 5 (1966) 1013

Govindjee, Owens, O.v.H. und G. Hoch, Biochim. Biophys. Acta 75 (1963) 281

Grimme, L.H., Chloridmangel und photosynthetische Teilreaktionen von Chlorella fusca, Dissertation, Friedrich-Alexander-Univ. Erlangen-Nürnberg (1971)

Healey, F.P. und J. Myers, Plant Physiol. 47 (1971) 373

Heber, U., Santarius, K.A., Urbach, W. und W. Ullrich, Z. Naturforsch. 19 b (1964) 576

Heber, U. und W. Santarius, Z. Naturforsch. 25 b (1970) 718

Heldt, H.W., Febs Letters 5 (1969) 11

Heldt, H.W. und L. Rapley, Febs Letters 10 (1970) 143

Hew, C.S. und G. Krotkov, Plant Physiol. 43 (1968) 464

Heytler, P.G. und W.W. Prichard, Biochem. Biophys. Res. Commun. 7 (1962) 272

Hill, R. und F. Bendall, Nature 186 (1960) 136

Hiyama, T., Nishimura, M. und B. Chance, Plant Physiol. 46 (1970) 163

Hoch, G., Owens, O.v.H. und B. Kok, Arch. Biochem. Biophys. 101 (1963) 171

Izawa, S., Connolly, G.D., Winget, G.D. und N.E. Good, in: Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus 169, Brookhaven Natl. Lab., Upton, N.Y. (1967)

Izawa, S., Heath, R.L. und G. Hind, Biochim. Biophys. Acta 180 (1969) 388

Jackson, W.A. und R.J. Volk, Annu. Rev. Plant Physiol. 21 (1970) 385

Jarett, L. und R.W. Hendler, Biochem istry 6 (1967) 1693

Jarett, L. und D.M. Kipnis, Nature 216 (1967) 714

Jeschke, W.D., Planta 73 (1967) 161

Jeschke, W.D. und W. Simonis, Planta 88 (1969) 157

Joliffe, P.A. und E.B. Tregunna, Plant Physiol. 43 (1968) 902

Joliot, A., Biochim. Biophys. Acta 126 (1966) 587

Kandler, O., Z. Naturforsch. 5 b (1950) 423

Kandler, O., Z. Naturforsch. 9 b (1954) 625

Kandler, O., Z. Naturforsch. 12 b (1957) 271

Kandler, O. und I. Haberer-Liesenkötter, Z. Naturforsch. 18 b (1963) 718

Kandler, O. und W. Tanner, Ber. dtsch. bot. Ges. 79 (1966) 48

Kessler, E., Planta 49 (1957) 435

Kessler, E., Arthur, W. und J.E. Brugger, Arch. Biochem. Biophys. 71 (1957) 326

Kessler, E., Planta 81 (1968) 264

Kobr, M.J. und H. Beevers, Plant Physiol. 47 (1971) 48

Kok, B., Enzymologia 13 (1948) 1

Kok, B. und G. Hoch, in: Light and Life, W.D. Mc. Elroy und B. Glass, eds., Baltimore (1961) 397

Kok, B., Rurainsky, H.J. und O.v.H. Owens, Biochim. Biophys. Acta 109 (1965) 347

Komor, E. und W. Tanner, Biochim. Biophys. Acta 241 (1971) 170

Kováč, L. und A. Istenesová, Biochim. Biophys. Acta 82 (1964) 162

Kováč, L. und S. Kužela, Biochim. Biophys. Acta 127 (1966) 355

Kowallik, W., Planta 58 (1962) 337

Kowallik, W., in: Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus, Brookhaven Symp. Biol. 19 (1966) 467

Kowallik, W., Plant Physiol. 42 (1967) 672

Kowallik, W. und H. Gaffron, Nature 215 (1967) 1038

Kowallik, U. und W. Kowallik, Planta 84 (1969) 141

Kowallik, W., Planta 86 (1969 a) 50

Kowallik, W., Planta 87 (1969 b) 372

Laudenbach, B. und A. Pirson, Arch. Mikrobiol. 67 (1969) 226

Leloir, L.F., Proc. Int. Biochem. 6 th Congr. New York (1964) 15

Levine, R.P. und W.T. Ebersold, Annu. Rev. Microbiol. 14 (1960) 197

Levine, R.P., Annu. Rev. Plant Physiol. 20 (1969) 523

Lookeren Campagne, R.N. van, Acta bot. neerl. 6 (1957) 543

Losada, M. und D.I. Arnon, in: Metabolic Inhibitors, R.M. Hochster und J.H. Quastel, eds., Academic Press, New York (1963)

Lowry, O.H. und J.V. Passoneau, Arch. Exp. Path. Pharmak. 248 (1964) 185

Ludwig, L.J., The Relationship Between Photosynthesis and Respiration in Sunflower Leaves, Dissertation, Queen's Univ., Kingston, Ontario, Canada (1968)

Lynen, F., Proceedings of the International Symposium on Enzym Chemistry, Tokyo and Kyoto (1957)

MacRobbie, E.A.C., Biochim. Biophys. Acta 94 (1965) 64

Malkin, S. und B. Kok, Biochim. Biophys. Acta 126 (1966) 413

Marré, E., Forti, G., Bianchetti, R. und B. Parisi, in: La Photosynthèse, Ed. Centre Natl. Rech. Sci., Paris (1963)

Marsh, jr., H.V., Galmiche, J. M. und M. Gibbs, Plant Physiol. 38 (1963) IV

Michels, H., Z. Bot. 35 (1940) 241

Mitchell, P. und J. Moyle, Biochem. J. 104 (1967) 588

Mohr, H. und K. Ohlenroth, Planta 57 (1962) 656

Mossberg, Y. und A.M. Mayer, J. exper. Bot. 15 (1964) 24

Mukasa, H., Itoh, M. und Y. Nosoh, Plant & Cell Physiol. 7 (1966) 683

Nührenberg, B., Photoreduktion und Wachstum bei einzelligen Grünalgen, Dissertation, Georg-August-Univ., Göttingen (1967)

Paschinger, H., Arch. Mikrobiol. 67 (1969) 243

Pickett, J.M., Carnegie Inst. Wash. Yearbook 66 (1967) 197

Pickett, J.M. und C.S. French, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57 (1967) 1587

Pirson, A. und W. Kowallik, Naturwissenschaften 47 (1960) 476

Pirson, A. und W. Kowallik, Photochem. Photobiol. 3 (1964) 489

Poskuta, J., Physiol. Plantarum 21 (1968) 1129

Pratt, L.H. und N.I. Bishop, Biochim. Biophys. Acta 153 (1968) 664

Ramaiah, A., Hathaway, J.A. und D.E. Atkinson, J. biol. Chem. 239 (1964) 3619

Ramsay, L.L. und W.J. Patterson, J. Assoc. Agric. Chem. 31 (1948) 139

Raven, J.A., J. exper. Bot. 22 (1971) 420

Rensen, J.J.S. van, Meded. Landbouwhogesch. Wageningen (Ned.) 71 - 9 (1971) 1 - 80

Ried, A., Biochim. Biophys. Acta 153 (1968) 653

Rosenstock, G. und A. Ried, in: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. XII/2, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer-Verlag (1960) 259

Santarius, K.A. und U. Heber, Biochim. Biophys. Acta 102 (1965) 39

Siegelmann, H.W. und E.M. Firer, Biochemistry 3 (1964) 418

Simon-Floss, Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen, Bd. I/14, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag (1967)

Simonis, W., Ber. dtsch. bot. Ges. 80 (1967) 395

Stanier, R.Y., Bacteriol. Rev. 25 (1961) 1

Syrett, P.J. und H.A. Wong, Biochem. J. 89 (1963) 308

Syrett, P.J., J. exper. Bot. 17 (1966) 641

Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y. und D.I. Arnon, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 49 (1963) 5

Tanner, W., Dächsel, L. und O. Kandler, Plant Physiol. 40 (1965) 1151

Tanner, W., Loos, E. und O. Kandler, in: Current in Photosynthesis, J.B. Thomas und J.C.Goedheer, eds., Donker, Rotterdam (1966) 243

Tanner, W. und O. Kandler, Z. Pflanzenphysiol. 58 (1967) 24

Tanner, W., Zinecker, U. und O. Kandler, Z. Naturforsch. 22 b (1967) 358

Tanner, W., Loos, E., Klob, W. und O. Kandler, Z. Pflanzenphysiol. 59 (1968) 301

Tanner, W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 36 (1969) 278

Tanner, W., Löffler, M. und O. Kandler, Plant Physiol. 44 (1969) 422

Tolbert, N.E. und R.K. Yamazaki, Ann. New York Acad. Sci. 168 (1969) 325

Trebst, A., Ber. dtsch. bot. Ges. 83 (1970) 373

Tregunna, E.B., Krotkov, G. und C.D. Nelson, Physiol. Plantarum 19 (1966) 723

Ullrich, W.R., Planta 100 (1971) 18

Umbreit, W.W., Burris, R.H. und J.F. Stauffer, Manometric techniques, Burgess Publ. Comp., Minneapolis, U.S.A. (1959)

Urbach, W. und W. Simonis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 17 (1964) 39

Uyeda, K. und E. Racker, J. biol. Chem. 240 (1965) 4682

Varner, J.E., in: Methods in Enzymology III, 397, Academic Press New York (1957)

Voskresenskaja, N.P., Dokl. Akad. Nauk SSSR 86 (1952) 429

Warburg, O., Biochem. Z. 103 (1920) 188

Warburg, O., Wasserstoffübertragende Fermente, Verlag Dr. W. Saenger, Berlin (1948)

Warburg, O., Gewitz, H.S. und W. Völker, Z. Naturforsch. 12 b (1957) 722

Weikard, J., Z. Naturforsch. 23 b (1968) 235

Wessels, J.S.C. und R. van der Veen, Biochim. Biophys. Acta 19 (1956) 548

Wiessner, W., Nature 205 (1965) 56

Wilson, A.T. und M. Calvin, J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 5948

Wintermans, J.F.G.M., Meded. Landbouwhogesch. Wageningen (Ned.) 55 (1955) 69 - 126

Witt, H.T., Müller, A. und B. Rumberg, Nature 191 (1961) 194

Witt, H.T., Suerra, B. und J. Vater, in: Current in Photosynthesis, J.B. Thomas und J.C. Goedheer, eds., Donker, Rotterdam (1966) 273

Zelitch, I., Plant Physiol. 41 (1966) 1623

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Chl.	Chlorophyll
CMU	3-(4-Chlorophenyl)-1,1-dimethylurea
Cyt.	Cytochrom
DCMU	3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethylurea
EDTA	Aethylendiamin-tetraessigsäure
Fd	Ferredoxin
FMN	Flavinmononucleotid
FP	Ferredoxin-NADP-Reduktase
M	molar
mM	millimolar
NAD(P)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (-phosphat)
$NAD(P)H_2$	reduzierte Form
PC	Plastocyanin
P_{DR}	Phytochrom-Dunkelrot
P_{HR}	Phytochrom-Hellrot
P_i	anorganisches Phosphat
PMS	Methylphenazonium-methosulfat

DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes möchte ich Herrn Professor Dr. O. Kandler und Herrn Professor Dr. W. Tanner herzlich danken.

Herrn Professor Dr. W. Tanner gilt mein besonderer Dank für seine zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und seine wertvollen Ratschläge in allen wissenschaftlichen und seine stete Anteilnahme auch an persönlichen Fragen.

Herrn Professor Dr. O. Kandler danke ich für seine konstruktive Kritik und sein freundliches Interesse am Fortgang der Arbeit.

Dank schulde ich auch Herrn Karl Stetter und Herrn Alfred Thanbichler für ihre wertvollen Hinweise.

LEBENSLAUF

Am 17. Oktober 1943 wurde ich, Günter Hirt, als Sohn des Oberingenieurs Peter Hirt und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Küspert, in Augsburg geboren.

Von 1949 bis 1955 besuchte ich die Wittelsbacher Volksschule in Augsburg. 1955 trat ich in die Holbein-Oberrealschule in Augsburg ein, wo ich im Juni 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich das Studium der Chemie, Biologie und Geographie an der Technischen Hochschule München. Nach dem 9.Semester im Frühjahr 1969 legte ich das Staatsexamen in Chemie und Biologie ab. Mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit begann ich im Juli 1969 am Botanischen Institut der Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. O. Kandler und Prof. Dr. W. Tanner. Während meiner Doktorarbeit war ich als studentische Hilfskraft tätig, daneben habe ich im Wintersemester 1969/70 und im Sommersemester 1970 zwei weitere Semester Biologie an der Universität München belegt. Vom 1.7.1970 bis zum 1.7.1971 war ich Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten an der Universität Regensburg. Mein Arbeitsplatz war auch während dieser Zeit das Botanische Institut der Universität München.

Seit August 1971 bin ich verheiratet.